



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Caracterización molecular y filogenética de cepas
emergentes del virus de la diarrea epidémica porcina
detectadas en el Perú**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias
Veterinarias con mención en Salud Animal

AUTOR

Gina Ruth CASTRO SANGUINETTI

ASESOR

Mercy Gisela RAMÍREZ VELÁSQUEZ

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Castro G. Caracterización molecular y filogenética de cepas emergentes del virus de la diarrea epidémica porcina detectadas en el Perú [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2016.

403

A
11(e)
49



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS MENCIÓN SALUD ANIMAL

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 15:00 horas del día martes 13 de diciembre de 2016, el Jurado Examinador de Tesis designado para llevar a cabo la Sustentación Pública, presidido por el profesor Mg. Alberto Manchego Sayán y constituido por los siguientes miembros docentes: Mg. Mercy Ramírez Velásquez (Asesora), Dr. Luis Luna Espinoza, Dra. Manuela Verástegui Pimentel y el Dr. César Gavidia Chucán, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

" Caracterización molecular y filogenética de cepas emergentes del Virus de la Diarrea Epidémica Porcina detectadas en el Perú", presentado por la M.V.

GINA RUTH CASTRO SANGUINETTI

Quien sustentó la tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias mención Salud Animal y absolver satisfactoriamente las preguntas y objeciones del Jurado y el público asistente obtuvo la calificación: DIECIOCHO (18)

A continuación, el jurado por intermedio de su Presidente informó a la Unidad de Posgrado para que proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias mención Salud Animal, a la M.V. Srta. **Gina Ruth Castro Sanguinetti**, ante el Consejo de Facultad.

Siendo las 16:30 horas del día martes 13 de diciembre de 2016, se dio por concluido el acto académico y el jurado procedió a suscribir la presente Acta.

.....
Mg. Alberto Manchego Sayán (P.P.D.E.)
Presidente

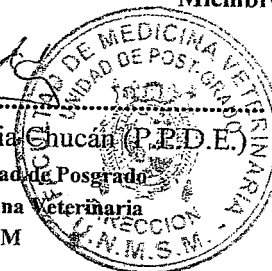
.....
Dr. Luis Luna Espinoza
Miembro (Jurado Externo)

.....
Dra. Manuela Verástegui Pimentel
Miembro (Jurado Externo)

.....
Mg. Mercy Ramírez Velásquez (P.Aux.D.E.)
Miembro (Asesora)

.....
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Miembro

.....
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM



Índice

Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Lista de cuadros	vi
Lista de figuras.....	vii
Lista de anexos.....	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Glosario.....	xi
I. Introducción	1
II. Revisión Bibliográfica	3
2.1. Situación de la Porcicultura	3
2.1.1. Mundial.....	3
2.1.2. Porcicultura Nacional	3
2.2. Diarrea Epidémica Porcina	4
2.2.1. Origen y evolución.....	4
2.2.2. Etiología.....	6
2.2.2.1. Coronavirus.....	6
2.2.2.2. Virus de la Diarrea Epidémica Porcina	8
a. Características morfológicas	8
b. Características genéticas y moleculares	10
c. Proteínas virales	10
i. Proteínas no estructurales.....	10
Replicasas	10
ORF3	11
ii. Proteínas estructurales.....	12
Proteína S.....	12
Proteína E	12
Proteína M	13
Proteína N.....	13
2.2.3. Replicación viral	13

2.2.4.	Aspectos relacionados a la patogénesis viral	14
2.2.4.1.	Tropismo celular	14
2.2.4.2.	Hospederos	15
2.2.4.3.	Transmisión	16
2.2.4.4.	Signos	17
2.2.4.5.	Lesiones	18
2.2.5.	Diagnóstico	19
2.2.5.1.	Aislamiento viral en cultivo celular.....	20
2.2.5.2.	Pruebas serológicas.....	21
2.2.5.3.	Pruebas moleculares	21
2.2.5.4.	Ensayos de inmunocromatografía.....	22
2.2.6.	Inmunidad frente a PEDV.....	22
2.2.7.	Caracterización genotípica y epidemiología molecular.....	24
2.2.8.	Prevención y control	26
2.2.9.	Importancia del análisis de proteína S	28
III.	Materiales y métodos	29
3.1.	Lugar de ejecución y periodo de ejecución	29
3.2.	Selección de muestras.....	29
3.3.	Metodología.....	31
3.3.1.	Procesamiento de las muestras	31
3.3.2.	Inmunocromatografía.....	31
3.3.3.	Confirmación por RT-PCR en tiempo real	31
3.3.3.1.	Extracción de ARN	31
3.3.3.2.	Prueba de RT-PCR en tiempo real.....	32
3.3.4.	Amplificación del dominio S1 por RT-PCR punto final	34
3.3.4.1.	Extracción de ARN.....	34
3.3.4.2.	Síntesis de ADN complementario	34
3.3.4.3.	Amplificación del dominio S1 por PCR.....	36
3.3.4.4.	Electroforesis en gel de agarosa	37
3.3.4.5.	Purificación de productos de PCR.....	37
3.3.5.	Secuenciamiento	38
3.3.6.	Análisis de secuencia nucleotídicas y análisis filogenético.....	38

IV.	Resultados.....	40
4.1.	Descripción de signos clínicos y hallazgos de necropsia	40
4.2.	Inmunocromatografía	42
4.3.	Confirmación por RT-PCR en tiempo real	43
4.4.	Amplificación de dominio S1	45
4.5.	Alineamiento múltiple y análisis filogenético	47
V.	Discusión	50
VI.	Conclusiones.....	59
VII.	Referencias Bibliográficas.....	60
VIII.	Anexos	70

Resumen

El Virus de la Diarrea Epidémica Porcina (PEDV) es el agente causal de severos cuadros entéricos que ocasiona mortalidades de hasta 100% en lechones lactantes ocasionando cuantiosas pérdidas económicas para la industria porcina a nivel mundial. La Diarrea Epidémica Porcina (PED) fue considerada una enfermedad exótica para el Perú hasta su confirmación en Setiembre del 2013. Hasta la fecha en el Perú se han producido diversos brotes de PED diagnosticados por sintomatología clínica, inmunocromatografía y posteriormente confirmados por RT-PCR en tiempo real. Sin embargo, ante la necesidad de información sobre el origen así como de la variabilidad en el país, el objetivo del presente trabajo fue realizar la caracterización molecular y filogenética de las cepas de PEDV detectadas en el Perú. Las muestras fueron seleccionadas de muestras positivas diagnosticadas mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real y posteriormente amplificadas mediante RT-PCR y secuenciadas. Se obtuvieron secuencias nucleotídicas del dominio S1 de 7 cepas peruanas, las cuales fueron alineadas y analizadas utilizando secuencias de cepas referenciales disponibles en GeneBank. El análisis filogenético, basado en el método de Neighbor-joining mediante el software MEGA 6.5, muestra a las 7 cepas peruanas ubicadas en el clado de cepas norteamericanas distribuidas en el genogrupo 1 (G1) o S-INDEL (n=1) y genogrupo 2 (G2) (n=6). Las 6 cepas peruanas G2 presentaron valores de identidad nucleotídica de 99.7–100.0% entre ellas y de 99.3-100.0% con cepas norteamericanas descritas desde el año 2013; la cepa S-INDEL (G1) peruana presentó valores de identidad nucleotídica de 99.6-99.7% con cepas S-INDEL norteamericanas; presentando mayor distancia genética con cepas asiáticas. Los resultados determinan el origen norteamericano de las cepas peruanas y la presencia de mutaciones puntuales evidencia nuevas variantes en el país.

Palabras clave: Diarrea Epidémica Porcina, PEDV, gen S, dominio S1, secuenciamiento, Perú.

Abstract

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is the causative agent of a severe enteric disease that causes high mortality up to 100% in suckling piglets resulting in great economic losses to porcine industry worldwide. Porcine epidemic diarrhea (PED) was considered as an exotic disease to Peru until its confirmation in September 2013. There were several PED outbreaks in Peru which diagnosis was based on clinical symptomatology, immunochromatography and subsequently confirmation by real time RT-PCR technique. However, it is needed further information about the origin and genetic diversity of Peruvian strains. The aim of this study was to determine the molecular and phylogenetic characterization of PEDV strains detected in Peru. Samples were selected from positive samples diagnosed by real time RT-PCR and subsequently amplified by RT-PCR and sequenced. Seven S1 domain nucleotidic sequences were obtained from Peruvian strains which were aligned and analyzed using reference sequences available in GeneBank. Phylogenetic analysis, based on neighbor-joining method of MEGA 6.5 software, showed that the seven Peruvian strains were located in North American clades distributed in Genogroup 1 (G1) o S-INDEL (n=1) and Genogroup 2 (G2) (n=6). The six G2 Peruvian strains shared 99.7-100% nucleotidic identity with each other and 99.3-100% identity with North American strains reported since 2013; the Peruvian S-INDEL strain (G1b) shared 99.6-99.7% nucleotidic identity with North American S-INDEL strains; and showing more genetic distance with Asiatic strains. Results determine the North American origin of Peruvian strains and the presence of punctual mutations shows new variants in the country.

Keywords: Porcine Epidemic Diarrhea, PEDV, S gene, S1 domain, sequencing, Peru.

Lista de cuadros

Cuadro 1.	Información de las 30 muestras positivas a PEDV preseleccionadas por cada evento ocurrido en el periodo 2013 a 2015. Lima – Perú.	30
Cuadro 2.	Cebadores específicos para el secuenciamiento del dominio S1 de PEDV.	37
Cuadro 3.	Información de las 11 muestras positivas a PEDV seleccionadas para el desarrollo de la metodología de secuenciamiento del dominio S1.	45
Cuadro 4.	Información de las siete (07) cepas utilizadas para el secuenciamiento nucleotídico del dominio S1 del gen S de PEDV.	46

Lista de figuras

Figura 1.	Esquema de la estructura del virión de PEDV..	9
Figura 2.	Representación esquemática de la organización genómica de PEDV.....	11
Figura 3.	Signos clínicos de PED observados en lechones.	41
Figura 4.	Hallazgos de necropsia de lechones afectados.	41
Figura 5.	Hallazgos histopatológicos en intestino delgado de lechones afectados.	42
Figura 6.	Resultados de pruebas de Inmunocromatografía.	43
Figura 7.	Curva de amplificación de la prueba de RT-PCR en tiempo real para la confirmación de la presencia de PEDV.	44
Figura 8.	Temperatura de Melting (Tm) de los productos amplificados en la prueba de RT-PCR en tiempo real para la confirmación de la presencia de PEDV.	44
Figura 9.	Electroforesis de los productos de la prueba de RT-PCR para la amplificación del dominio S1 de PEDV.	46
Figura 10.	Árbol filogenético basado en el análisis del dominio S1 de cepas de PEDV peruanas y referenciales.	49

Lista de anexos

Anexo 1.	Protocolo de extracción de ARN viral.....	70
Anexo 2.	Protocolo de Extracción y Purificación de ADN a partir de gel de agarosa.....	71
Anexo 3.	Información de las cepas referenciales PEDV globales utilizadas para el análisis filogenético de las cepas PEDV peruanas.	72
Anexo 4.	Tabla de distancia genética entre las cepas PEDV peruanas y cepas referenciales, basada en el análisis del dominio S1.....	73
Anexo 5.	Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas del dominio S1 del gen S de las cepas PEDV peruanas.....	74

Lista de Abreviaturas

aa	Aminoácido
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APN	Aminopeptidasa N
ARN	Ácido Ribonucleico
ADNc	ADN complementario
CoV	Coronavirus
Ct	Ciclo umbral (del inglés: <i>Threshold cycle</i>)
ECP	Efecto citopático
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (del inglés: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ERGIC	Compartimento intermedio Retículo endoplasmático-Golgi (del inglés: <i>endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment</i>)
GALT	Tejido linfoide asociado a intestinos (del inglés: <i>Gut-associated lymphoid tissue</i>)
IF	Inmunofluorescencia
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IHQ	Inmunohistoquímica (Del inglés: <i>Immunohistochemistry</i>)
IL	Interleucina
IRF	Factor regulador de interferón (del inglés: <i>Intreferon Regulatory Factor</i>)
MERS	Síndrome Respiratorio del Oriente Medio (del inglés: <i>Middle East Respiratory Syndrome</i>)
MERS-CoV	Coronavirus del Síndrome Respiratorio del Oriente Medio (del inglés: <i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>)
NF- κB	Factor nuclear Kappa B o Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés: <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NJ	Análisis de distancia Neighbor joining
ORF	Marco de lectura abierto (del inglés: <i>Open Reading Frame</i>)

pAPN	Aminopeptidasa N porcina
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa (del inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PED	Diarrea Epidémica Porcina (del inglés: <i>Porcine Epidemic Diarrhea</i>)
PEDV	Virus de la Diarrea Epidémica Porcina (del inglés: <i>Porcine Epidemic Diarrhea Virus</i>)
RE o ER	Retículo endoplasmático (Del inglés: <i>Endoplasmatic reticulum</i>)
RFS	Secuencia de cambio de marco del ribosoma (del inglés: <i>Ribosome frame-shifting sequence</i>)
RIG	Gen inducible por ácido retinoico (del inglés: <i>Retinoic acid-inducible gene</i>)
RNP	Ribonucleoproteína
RTC	Complejo de replicación y transcripción (del inglés: <i>Replication and transcription complex</i>)
RT-PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (del inglés: <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
SARS	Síndrome Respiratorio Agudo Severo (del inglés: <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>)
SARS-CoV	Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (del inglés: <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>)
ST	Cultivo celular de testículo porcino (del inglés: <i>Swine testis</i>)
TGE	Gastroenteritis Transmisible (del inglés: <i>Transmissible Gastro-Enteritis</i>)
TGEV	Virus de la Gastroenteritis Transmisible (del inglés: <i>Transmissible Gastro-Enteritis Virus</i>)
Tm	Temperatura de disociación o “melting” (del inglés: <i>Melting temperature</i>)
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés: <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
VERO	Cultivo celular de riñón de mono verde africano (del esperanto: “verda reno” y “vero”, que significan “riñón verde” y “verdad”).
VN	Virus neutralización

Glosario

- INDEL** Contracción de “inserción y deleción”. Término en biología molecular referido a las bases de ADN o ARN insertadas o deleccionadas en el genoma de un organismo.
- S-INDEL** Referido a las bases nucleotídicas insertadas o deleccionadas en el gen de la proteína S de un agente viral como en el caso de Coronavirus.

I. Introducción

La Diarrea Epidémica Porcina (PED) es una enfermedad entérica altamente contagiosa que está causando grandes pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial. Afecta principalmente a lechones lactantes, generalmente de 1 a 2 semanas de edad, ocasionando severos cuadros de diarrea, vómitos, deshidratación y alta mortalidad que puede alcanzar hasta el 100% de los lechones. Sin embargo, cerdos de todas las edades son susceptibles a la infección.

El Virus de la PED está muy relacionado al virus de la Gastroenteritis Transmisible (TGEV), ambos pertenecen al género coronavirus de la familia *Coronaviridae*. Estos dos agentes virales ocasionan los mismos cuadros entéricos siendo difícil diferenciarlos clínicamente por lo que, la prueba molecular de Retrotranscripción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) es la más idónea para su identificación. Los genes virales ORF3 y M, son los más utilizados para la identificación viral por ser los más conservados dentro del genoma viral. Asimismo, el dominio S1 del gen S es utilizado como blanco para analizar la variabilidad genética de cepas del PEDV.

La PED fue considerada una enfermedad exótica en el Perú hasta su confirmación en Setiembre del 2013, fecha en la cual la Sección de Virología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) reportó su presencia en coordinación con el Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA (SENASA, 2013) en una granja tecnificada de la provincia de Lima. Las pruebas empleadas para su identificación fueron el kit rápido de inmunocromatografía (BIONOTE, Korea) y posteriormente fue confirmado por la prueba de RT-PCR en tiempo real dúplex que permitió diferenciar el TGEV y PEDV en una sola corrida. Las muestras que se utilizaron fueron heces de lechones con sintomatología clínica sugerente de la enfermedad y con una mortalidad hasta del 100% en las granjas afectadas.

Estudios realizados por Ramírez *et al.*, 2014, (datos no publicados) detectaron al PEDV en el 86.5% utilizando Inmunocromatografía siendo el 96.9% confirmados por la prueba de RT-PCR dúplex en tiempo real en muestras de heces de animales clínicamente enfermos. Desde su emergencia hasta la fecha se han identificado más de 30 cepas de PEDV en granjas porcinas tecnificadas y no tecnificadas en nuestro país, sin embargo, la metodología empleada no permite determinar el origen de estas cepas. Por esta razón el objetivo del estudio es caracterizar molecularmente y filogenéticamente las cepas emergentes del PEDV en nuestro país obtenidas de lechones de 1 a 3 semanas de edad en los años 2013 y 2014, mediante el secuenciamiento del dominio S1 del gen S, teniendo como hipótesis que los brotes ocurridos tienen como origen a las cepas norteamericanas debido a la estrecha relación comercial porcina existente entre Perú y Estados Unidos.

El análisis genético y filogenético de las cepas del PEDV aisladas en el Perú mediante el secuenciamiento del dominio S1 del gen S es importante para determinar la procedencia del virus que existe en el país, así como conocer la diversidad genética de las cepas para entender mejor la evolución natural del virus bajo las condiciones de crianza y manejo en el Perú; información que sería importante para la implementación de programas de prevención, control y erradicación de esta enfermedad.

II. Revisión Bibliográfica

2.1. Situación de la Porcicultura

2.1.1. Mundial

La carne de cerdo es la más consumida a nivel mundial. En las últimas décadas, su demanda se ha visto incrementada como resultado de cambios en los patrones de consumo a medida que mejora la economía en los países en desarrollo. Reportes de la FAO indican que en el 2015 el número de porcinos superó los mil millones de cabezas a nivel mundial, siendo la producción de más rápido crecimiento a nivel ganadero, sólo superado por la producción avícola (FAO, 2016).

2.1.2. Porcicultura Nacional

En el Perú, la población porcina según el último Censo Agropecuario realizado en el año 2012 ascendió a 2' 224 300 cabezas, indicándose que la categoría de mayor producción corresponde a criollos con un 67.2%, mientras que la categoría de mejorados con un 32.8% (INEI, 2013). Reportes preliminares del año 2015 y 2016 indican que actualmente existen 3.4 millones de cerdos a nivel nacional, con una saca de 2.3 millones de cerdos, lo cual representa un rendimiento del 65% de kilogramos de carne. El consumo de carne de cerdo en el Perú, aunque bajo en comparación con otros países, aumentó de 4.6 kilogramos per cápita en el 2015 a 5.5 kg per cápita según reportes parciales del año 2016. Lima corresponde a la región del Perú con mayor producción de carne de cerdo en los últimos años, 42% de la producción de carne porcina nacional (ASOPORCI, 2016).

2.2. Diarrea Epidémica Porcina

2.2.1. Origen y evolución

La Diarrea Epidémica Porcina fue por primera vez reconocida en Reino Unido en 1971 como una enfermedad entérica devastadora de cerdos de cría y engorde, la cual se dispersó a otros países europeos a lo largo de la década de los 70s (Huang *et al.*, 2013; Lee, 2015). El agente etiológico fue identificado como un coronavirus, el Virus de la Diarrea Epidémica Porcina (PEDV, *Porcine Epidemic Diarrhea Virus*, siglas en inglés), cepa CV777, en Bélgica en 1978 (Saif *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013).

Durante los años 80s y 90s, los brotes en Europa se observaron en Bélgica, Inglaterra, Alemania, Francia, Países Bajos y Suiza, sin embargo se hicieron cada vez más infrecuente, persistiendo el virus de forma endémica a muy bajo nivel en la población porcina (Lee, 2015). Los brotes esporádicos reportados en los países europeos causaron diarrea en lechones al destete y engorde, sin embargo, a pesar de que la serología evidenció baja inmunidad al agente, éste no llegó a causar severos brotes en los animales susceptibles. Los mecanismos de resistencia en este periodo no han sido aclarados (Jung y Saif, 2015; Lee, 2015).

En Asia, la enfermedad ha sido reportada desde los 80s en diversos países como China y Corea del Sur principalmente, además de Japón, Tailandia y Vietnam. La enfermedad se dispersó rápidamente causando una severa epidemia en los diversos países a lo largo de las décadas de los 80s y 90s, y con cuadros clínicos más agudos y severos en comparación con los descritos en los países europeos (Huang *et al.*, 2013; Lee, 2015). PEDV ha sido reportado desde entonces en diversos países europeos y asiáticos como República Checa, Hungría, Francia, Países Bajos, Suiza, España, Italia, Alemania y Filipinas (Song y Park, 2012; Park *et al.*, 2014). En Tailandia ocurrieron brotes severos de PED en el 2007, y los estudios genéticos revelaron gran cercanía a las cepas coreanas y chinas del genogrupo 2. Esta cepa continúa siendo causante de brotes esporádicos en Tailandia (Jung *et al.*, 2014). De igual manera en Vietnam se presentaron brotes severos en el periodo 2009-2010, siendo las cepas causantes cercanas a las cepas chinas del genogrupo 2 (Duy *et al.*, 2011; Vui *et al.*, 2014).

En el año 2010, se reportaron brotes masivos y más severos de PED en China, presentando cuadros de considerable morbilidad y mortalidad en los lechones lactantes. Esta presentación fue asociada a una nueva cepa variante de PEDV, genéticamente distante de las cepas previamente reportadas en China (Huang *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2015). Desde entonces, China presentó constantes brotes de diarrea de 80-100% de morbilidad y 50-90% de mortalidad en lechones lactantes, lo que causó gran consternación en la industria porcina de China, ubicando a esta enfermedad como una de las de mayor importancia. Posteriormente esta nueva presentación clínica se diseminó a otros países asiáticos (Huang *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2015).

El virus de la Diarrea epidémica porcina se consideró como un agente exótico en los Estados Unidos hasta su detección en mayo del 2013 en el estado de Iowa. A partir de entonces, PEDV se diseminó rápidamente en las granjas porcinas en 31 estados, llegando también a Canadá y México, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas y gran preocupación en la industria porcina (Oka *et al.*, 2014; Jarvis *et al.*, 2016). Rápidamente, la enfermedad se diseminó a Latinoamérica, siendo reportada en Perú (2013) (SENASA, 2013), República Dominicana, Colombia y Ecuador (2014) (Huang *et al.*, 2013; Oka *et al.*, 2014; Lee, 2015; Jarvis *et al.*, 2016).

Los estudios genéticos y filogenéticos realizados en las cepas emergentes revelaron una estrecha relación con cepas chinas, especialmente la cepa AH2012, asilada en la provincia de Anhui, China en el año 2012, siendo éste su sugerente origen. Posteriormente se sugirió que el origen de las cepas emergentes estadounidenses descenden potencialmente de dos cepas chinas, AH2012 (GenBank: KC210145) y CH/ZMDZY/11 (GenBank KC196276), en el subgrupo G2a mediante recombinación (Tian *et al.*, 2014; Vlasova *et al.*, 2014). Estas cepas fueron reportadas en 2011 y 2012 respectivamente (Huang *et al.*, 2013; Jung y Saif, 2015). Los signos clínicos y las lesiones macroscópicas e histológicas descritas en los brotes de Estados Unidos fueron similares a los observados en China (Huang *et al.*, 2013).

En Febrero de 2014, nuevas cepas de PEDV fueron reportadas en los Estados Unidos, como la cepa OH851 (GeneBank: KJ399978), denominadas

cepas “variantes US” (variantes estadounidenses), las cuales se caracterizaron por presentar las mismas inserciones y deleciones en la región S1 del gen S, de igual manera observado en la cepa clásica original CV777 (Lee, 2015; Jarvis *et al.*, 2016). Posteriormente denominadas cepas S-INDEL (inserciones y deleciones en el gen S), estas cepas fueron asociadas con cuadros clínicos de menor virulencia y menor frecuencia, lo cual estaría relacionado a una capacidad de transmisión reducida (Vlasova *et al.*, 2014). Así mismo, los estudios retrospectivos de Vlasova y colaboradores (2014), evidenciaron que las variantes US ya estaban presentes y circulando en los Estados Unidos desde Junio de 2013, sugiriendo un ingreso múltiple de cepas PEDV a los Estados Unidos en un mismo periodo de tiempo.

Posteriormente, cepas altamente virulentas fueron descritas en Corea del Sur, Japón y Vietnam durante el 2013 y 2014. El estudio genético reveló una estrecha relación con cepas Norteamericanas, sugiriendo el origen de dichos brotes (Lv *et al.*, 2016).

Actualmente PED no está incluida en la lista de enfermedades de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), por lo que no se han establecido restricciones oficiales para el control de la enfermedad, sin embargo, se ha producido un aumento en el número de notificaciones a través del Sistema Mundial de Información Zoonosaria de la OIE como una enfermedad emergente por los países miembros (OIE, 2014). En los Estados Unidos, en junio de 2014 el Departamento de Agricultura de EE.UU - APHIS (USDA-APHIS) emitió una orden federal de notificación de brotes confirmados de PED a la USDA o a entidades oficiales de salud animal estatales (USDA-APHIS, 2014).

2.2.2. Etiología

2.2.2.1. Coronavirus

Los Coronavirus (CoV) se observan en una gran variedad de animales, afectando a humanos, otros mamíferos y aves, usualmente causando cuadros respiratorios y gastrointestinales clínicos o subclínicos, así como cuadros hepáticos y neurológicos en diferentes niveles de severidad (Woo *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013).

Los virus pertenecientes al orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae* son únicos entre los virus ARN por su genoma de gran tamaño (inusual en virus ARN), el cual tiene un sentido positivo. En promedio poseen 30,000 bases, 2 a 3 veces más que los genomas ARN de otros virus (Sawicki, 2009). Este grupo se caracteriza a su vez, por la disposición y relación entre los marcos de lectura abiertos (ORF) dentro de su genoma y por la presencia, en las células infectadas, de múltiples moléculas de ARNm subgenómico en conjunto con el ARN genómico, durante la replicación viral mediante un mecanismo discontinuo (Sawicki, 2009). Dentro del orden *Nidovirales* se ubica también la familia *Arterividae* con quien comparte gran similitud en la organización genómica y estrategia de replicación (Lee, 2015). Las otras dos familias que se encuentran el mismo orden son *Toroviridae* y *Roniviridae*.

Basado en el análisis genético, la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae* presenta cuatro géneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. El murciélago es considerado como el hospedero fuente de los *Alfacoronavirus* y *Betacoronavirus*, mientras que los *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* derivarían de las aves (Huang *et al.*, 2013; Jung y Saif, 2015).

El grupo de los *Alfacoronavirus* incluye dos coronavirus enteropatógenos específicos de porcinos, el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV) y el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), los cuales son distinguibles antigénicamente (Lai *et al.*, 2007). El Virus de la Gastroenteritis Transmisible es causante de una gastroenteritis fatal, altamente contagiosa, principalmente en lechones menores de 2 semanas de edad a nivel mundial, pudiendo alcanzar tasas de mortalidad del 100% (Chae *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2015).

El *Deltacoronavirus* porcino (PDCoV) es un nuevo coronavirus emergente en Estados Unidos con reportes clínicos de diarrea en cerdos jóvenes en el 2014, con cuadros clínicos consistentes en diarrea acuosa en marranas y lechones, y mortalidades observadas sólo en lechones. La enfermedad fue clínicamente similar a la diarrea epidémica porcina (PED) y a la gastroenteritis transmisible (TGE), sin embargo la severidad fue moderada y de baja mortalidad en lechones.

Al igual que PEDV, no existe evidencia de que el PDCoV sea transmisible a los seres humanos. Actualmente no existen tratamientos ni vacunas disponibles para PDCoV (Hu *et al.*, 2015).

La emergencia de dos agentes patógenos betacoronavirus humanos, el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV) en el año 2002 y el virus del Síndrome Respiratorio del Oriente Este (MERS-CoV) en el año 2012, han constituido un tema de gran preocupación en salud pública sobre las enfermedades pandémicas asociadas a coronavirus (Huang *et al.*, 2013; Woo, *et al.*, 2012). Actualmente, MERS-CoV continúa siendo un problema en los países de la península arábiga y países cercanos (OMS, 2016).

2.2.2.2. Virus de la Diarrea Epidémica Porcina

El agente etiológico de la diarrea epidémica porcina pertenece al orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*; corresponde a un virus ARN de cadena simple y polaridad positiva, con el genoma de mayor tamaño conocido como infectivo en el ser humano y diversas especies animales (Huang *et al.*, 2013).

El virus de la diarrea epidémica porcina es un miembro del género *Alfacoronavirus*, perteneciente a la subfamilia *Coronavirinae*, causante de la enfermedad del mismo nombre, el cual ocasiona severos cuadros diarreicos principalmente en lechones lactantes, acompañado de altas tasas de morbilidad y mortalidad, lo cual toma gran importancia al significar cuantiosas pérdidas económicas para la industria porcina (Lai *et al.*, 2007; Song y Park, 2012).

a. Características morfológicas

El Virus de la Diarrea Epidémica Porcina es un virus con envoltura, de forma esférica pleomórfica, el cual presenta un tamaño aproximado de 95 a 190nm (diámetro promedio de 130nm), incluyendo sus proyecciones (espículas), las cuales se observan como estructura homotriméricas, de 18-23nm de longitud (Song y Park, 2012; Jung y Saif, 2015), que protruyen de forma perpendicular a

la envoltura viral, y es responsable de la característica disposición de “corona” de los coronavirus observado en microscopía electrónica (Lissenberg *et al.*, 2005; Witch, 2014).

Dentro del virión se encuentra el genoma viral de ARN de cadena simple, sentido positivo, no segmentado, asociado a la proteína N (55-58kDa), formando el complejo ribonucleoproteína (RNP) de conformación helicoidal. El virus está circunscrito por una envoltura lipoproteica la cual contiene las proteínas estructurales: proteína de la espícula glicosilada (S, Spike), proteína de la envoltura (E), y proteína de la matriz (M); cuyos pesos moleculares corresponden a 180-220 kDa, 7kD y 27-32kDa, respectivamente (Fig. 1).

Entre sus propiedades biológicas y fisicoquímicas se describen que PEDV posee una densidad de flotación (buoyant) de 1.18 g/ml. PEDV es estable de 4-50°C y es completamente inactivado a pH inferior de 4 y superior a 9. Asimismo, es fácilmente inactivado mediante diversos desinfectantes ácidos o alcalinos, como éter o cloroformo (Hofmann y Wyler, 1989; Jung y Saif, 2015).

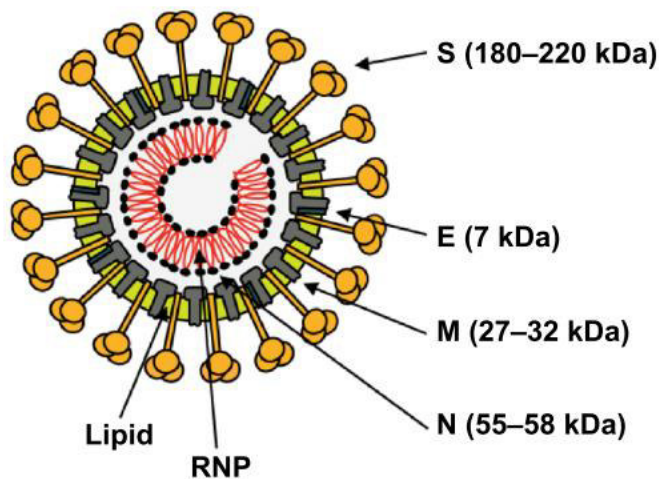


Figura 1. Esquema de la estructura del virión de PEDV. Se observa el complejo ribonucleoproteína (RNP) encerrado por la envoltura lipoproteica, la cual contiene las proteínas S, E y M. Los pesos moleculares se indican entre paréntesis. (Ilustración tomada de Lee, 2015).

b. Características genéticas y moleculares

El virus de la diarrea Epidémica Porcina posee un genoma ARN de cadena simple y polaridad positiva, y tiene aproximadamente un tamaño de 28kb, con un extremo conteniendo una caperuza (-cap) 5' y una cola poliadenilada (poli A) 3' (Park *et al.*, 2007; Song y Park, 2012). El genoma está compuesto por una región no traducidas (UTR, untranslated region, siglas en inglés) en el extremo 5'; y otra región UTR en el extremo 3', y siete marcos de lectura (ORF, open reading frame, siglas en inglés): ORF1a, ORF1b y ORF2, 3, 4, 5 y 6 (Park *et al.*, 2007; Song y Park, 2012, Temeeyasen *et al.*, 2014). ORF1 y ORF3 codifican genes de proteínas no estructurales, las replicasas (replicasa 1a, replicasa 1b) y la proteína accesorio respectivamente. Los demás ORF2, 4, 5 y 6, codifican las proteínas estructurales: la poliproteína de la espícula (S (spike)), proteína de envoltura (E), proteína de membrana (M), y proteína del nucleocápside (N) (Fig. 1) (Song y Park, 2012; Temeeyasen *et al.*, 2014).

c. Proteínas virales

i. Proteínas no estructurales

Replicasas

El gen de la polimerasa (poliproteína replicasa) consiste en dos ORFs, 1a y 1b, que abarcan los dos tercios del genoma viral desde el extremo 5', la cual generará la proteína replicasa 1a y 1b (Song y Park, 2012). La traducción de ORF1a produce una poliproteína replicasa (pp) 1a, mientras que la traducción de ORF1b se produce por un RFS (cambio de marco ribosómico, siglas en inglés: *Ribosomal frame shift*), que incluye pp1a y pp1ab. Posterior a la traducción, estas poliproteínas se cortan por proteasas internas para generar los 16 productos proteicos finales, denominados nsp1-16, de las cuales se describen al menos 8 actividades enzimáticas definidas (Sawicki *et al.*, 2007; Lee, 2015) (Fig. 2).

ORF3

El gen ORF3 es el único gen accesorio en el caso de PEDV, a diferencia de otros coronavirus, y codifica una proteína accesorio la cual tiene un rol importante en la virulencia, y su pérdida resulta en atenuación viral en el hospedero natural (Pan *et al.* 2012; Song y Park, 2012). Esta proteína funciona como un canal iónico que influye en la producción viral (Wang *et al.*, 2012; Chen X. *et al.*, 2013; Lee, 2015). La adaptación del virus en cultivo celular ha sido utilizada para alterar el gen ORF3 con el fin de reducir la virulencia, como ha sido en el caso de TGEV (Song y Park, 2012). Las cepas adaptadas y vacunales presentan alta identidad nucleotídica con las cepas de campo originales a excepción de algunas variaciones en el gen ORF3, principalmente una delección continua característica de 17 aminoácidos entre los aminoácidos 82-99 (Temeeyasen *et al.*, 2014). Por tanto, la diferenciación del gen ORF3 puede ser marcador de adaptación y atenuación del virus, y de esta manera ser herramienta útil en los estudios de epidemiología molecular de PEDV para diferenciar cepas de campo de las vacunales (Park *et al.*, 2008; Song y Park, 2012; Chen X. *et al.*, 2013).

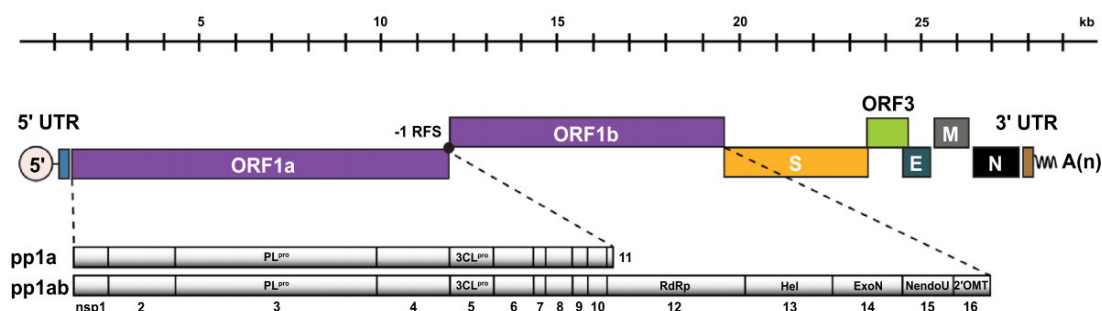


Figura 2. Representación esquemática de la organización genómica de PEDV.

Se observa la estructura de genoma ARN de PEDV de aproximadamente 28kb. El genoma se encuentra flanqueado por UTRs; es policistrónico y abarca ORFs de las replicasas 1a y 1b, seguidos de los genes que codifican las proteínas S (espícula), ORF3, E (envoltura), M (membrana) y N (nucleoproteína). La expresión de ORF 1a y 1b producen las poliproteínas pp1a y pp1ab mediante 1 RFS. Luego de la traducción, son escindidas por proteasas internas generando 16 proteína no estructurales (nsp1-16). PLpro, papain-like cysteine protease; 3CLpro, 3C-like cysteine protease; RdRp, RNA-dependent RNA polymerase; Hel, helicase; ExoN, 3'→5' exonuclease; NendoU, nidovirus uridylyate-specific endoribonuclease; 2'OMT, ribose-2'-O-methyltransferase (Esquema tomado de Lee, 2015).

ii. Proteínas estructurales

Proteína S

La proteína S es una glicoproteína tipo I ubicada en la superficie viral, compuesta de 1,383 a 1,386 aminoácidos (aa), dependiendo de las cepas. Posee un péptido señal (1-18 aa), epítopes de neutralización (499-638, 748-755, 764-771 y 1368-1374 aa), un dominio transmembrana (1334-1356 aa), y un dominio citoplasmático (Song y Park, 2012; Oh *et al.*, 2014). Cumple un importante rol en la regulación de la interacción con los receptores específicos de las células hospederas; y la inducción de anticuerpos neutralizantes en el hospedero natural (Li *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011). Así mismo, está asociada a la adaptación al crecimiento *in vitro* y atenuación de virulencia *in vivo* (Park *et al.*, 2007; Song y Park, 2012).

La proteína S conforma las proyecciones características situadas en la superficie de la nucleocápside, la cual consiste en dos dominios, el dominio S1 (1-789 aa) y dominio S2 (790-1383 aa), basado en su homología con la proteína S de otros coronavirus (Oh *et al.*, 2014; Song y Park, 2012; Langel *et al.*, 2016). El dominio S1 está asociado a la adhesión viral, la unión a los receptores de la célula hospedera; el dominio S2 conlleva a cambios conformacionales posteriores a la unión del dominio S1, permitiendo la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula hospedera, facilitando la entrada del genoma viral al medio intracelular (Temeeyasen *et al.*, 2014; Langel *et al.*, 2016).

Proteína E

Es una pequeña proteína transmembrana de 76-109 aminoácidos de longitud. Esta secuencia de aminoácido es muy divergente entre los diferentes Coronavirus, a pesar de que su estructura es considerada altamente conservada. La proteína E posee un rol importante en el ensamblado de los viriones, donde puede inducir la curvatura de la membrana o ayudar en la escisión de la membrana (Park *et al.*, 2013). A esta proteína también se le atribuyen funciones durante la infección, así como durante el egreso del virus y en la respuesta del hospedero (Park *et al.*, 2013; Lee, 2015).

Proteína M

La proteína M, el componente más extenso en la envoltura, es una glicoproteína estructural de tres columnas, con un pequeño dominio amino-terminal en la parte externa del virus, y un gran dominio c-terminal en el interior viral (Song y Park, 2012). Posee un rol importante en el proceso de ensamblaje e induce la producción de anticuerpos que neutralizan al virus en presencia de proteínas del complemento. Mayor conocimiento de esta glicoproteína permitirá entender la relación genética y diversidad de las cepas y la situación epidémica en campo (Song y Park, 2012; Sun *et al.*, 2014).

Proteína N

La proteína N es una fosfoproteína básica asociada al genoma, la cual se une al ARN del virión, protege el genoma y provee una base estructural para el nucleocápside helicoidal (Song y Park, 2012). De esta manera, puede ser usado como blanco para el diagnóstico preciso y temprano de la infección por PEDV. La proteína N es importante en la inmunidad celular, debido a su rol antagónico en la inducción de la producción de interferón como parte de su estrategia de evasión (Song y Park, 2012; Lee, 2015).

2.2.3. Replicación viral

La replicación viral ha sido localizada principalmente en el citoplasma de las células epiteliales de las vellosidades a lo largo de todo el intestino delgado (Park y Shin, 2014). Posterior a la unión del virus a la célula hospedera a través de la unión de la proteína S viral a la proteína aminopeptidasa N porcina (pAPN) en la superficie celular, se lleva a cabo la penetración y desenvolvimiento del virus tras la fusión de la envoltura viral y la membrana plasmática (Sawicki, 2009; Nam y Lee, 2010). Seguido del desensamblado del virus, el genoma viral es liberado en el citoplasma e inmediatamente son traducidas las replicasas pp1a y pp1ab. Estas poliproteínas son seccionadas en 16nsps que comprenden el complejo de replicación y transcripción (RTC, *Replication and transcription complex*), el cual

en un principio llevarán a cabo la síntesis de la cadena de ARN negativa utilizando como base el ARN genómico. Ambas, la cadena completa y cadenas subgenómicas negativas son producidas y utilizadas como molde para la síntesis de ARN genómico y ARNm subgenómicos (Sawicki 2009; Saif *et al.*, 2012).

Cada ARNm subgenómico es traducido para producir una única proteína codificada por el ORF 5' del ARNm subgenómico. Las proteínas estructurales S, E y M son insertadas en el retículo endoplasmático (RE) y son anclados en el aparato de Golgi. La proteína N interactúa con el ARN genómico recientemente sintetizado para formar el complejo helicoidal Ribonucleoproteína (RNP). La progenie viral es ensamblada mediante “inclusión” del complejo RNP en el compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC) en la vía secretoria. La liberación del virus ocurre por un proceso tipo exocitosis, por fusión de membranas de las vesículas que contienen a los viriones con la membrana plasmática (Sawicki *et al.*, 2007; Lee, 2015).

2.2.4. Aspectos relacionados a la patogénesis viral

En el estudio de infección experimental llevado a cabo por Debouk y Pensaert, 1980, utilizando la cepa prototipo CV777, se demostró la replicación viral en las células epiteliales de las vellosidades de intestino delgado, principalmente yeyuno e íleon, e intestino grueso de lechones. El virus produce atrofia de las vellosidades, malabsorción y diarrea (Kim y Chae, 2000; Park y Shin, 2014).

2.2.4.1. Tropismo celular

El virus PED presenta un marcado tropismo por las células epiteliales intestinales porcinas. Se ha demostrado que PEDV se une a la aminopeptidasa N (APN) en su hospedero natural como su receptor funcional para el ingreso a la célula, al igual que TGEV y otros Coronavirus del grupo Alfacoronavirus (Oh *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007; Nam y Lee, 2010). La APN, también conocida como CD13, es una glicoproteína tipo II de 150 kDa que pertenece a la familia

metaloproteasa de unión a membrana. La expresión de este receptor es predominante en la superficie de células epiteliales de riñón, intestino delgado y tracto respiratorio, donde, mediante tripsina, la proteína S puede cortarse en dos subunidades, N-terminal (95kDa) y C-terminal (50kDa), y volverse funcional para el proceso de fusión e ingreso a la célula (Nam y Lee, 2010). La alta densidad del receptor en la superficie de los enterocitos facilita el ingreso y replicación de PEDV (Li *et al.*, 2007; Jung y Saif, 2015).

Mediante estudios inmunohistoquímicos se pudo determinar la abundante presencia de antígeno viral en los enterocitos de las vellosidades intestinales, y menor presencia a nivel de criptas en toda la extensión delgado. A nivel de intestino grueso, poca presencia de antígeno es detectada (Stevenson *et al.*, 2013; Madson *et al.*, 2014). PEDV no ha sido detectado en otros órganos como tonsilas, bazo, píloro, hígado o riñón. Sin embargo, acorde a diversos reportes, PEDV también ha sido detectado en macrófagos pulmonares infiltrados en la lámina propia (Lee *et al.*, 2000; Park y Shin, 2014). La infección de los macrófagos refleja la posibilidad de diseminación o de la presencia de infecciones y replicación extraintestinal observados en otras especies afectadas por coronavirus (Gu *et al.*, 2005; Park y Shin, 2014).

Los Alfacoronavirus, TGEV y PEDV, utilizan el mismo receptor en los enterocitos del intestino delgado (pAPN), sin embargo, se utilizan distintas líneas celulares para su cultivo *in vitro*: PEDV se pueden adaptar a células VERO (Mono verde africano), pero no a cultivo celular de testículo porcino (Swine testis, ST) que expresan débilmente el receptor pAPN, donde TGEV sí puede adaptarse (Hoffman y Wyler, 1988; Li *et al.*, 2007 Nam; y Lee, 2010). Aunque no se descifra claramente la discrepancia en este mecanismo, se puede deducir que PEDV requiere de la expresión abundante del receptor para su unión a la célula (Nam y Lee, 2010).

2.2.4.2. Hospederos

Los Coronavirus tienen un limitado rango de hospederos, el cual está determinado por la interacción de la glicoproteína S viral con su receptor en la

superficie de las células susceptibles (Bosch *et al.*, 2003; Nam y Lee, 2010). Los suinos son los únicos hospederos conocidos de PEDV. No afecta a humanos ni a otras especies domésticas (Pospischil *et al.*, 2002). Se ha demostrado específicamente que los ratones no constituyen un vector competente para el virus (Kamau *et al.*, 2010). Como se describió anteriormente, el Virus de la Diarrea Epidémica Porcina se une específicamente a APN porcina afectando únicamente a esta especie. Puede afectar cerdos de cualquier edad, observándose cuadros severos en los lechones lactantes (Song y Park, 2012; Lee, 2015).

2.2.4.3. Transmisión

El virus se propaga de forma directa o indirecta principalmente a través de la vía fecal-oral. Así mismo, la transmisión aerógena también ha comprobado tener un rol importante en la diseminación de PEDV bajo ciertas condiciones (Alonso *et al.*, 2014). Las heces diarreicas, los vómitos y otros fómites contaminados constituyen la principal fuente de transmisión del virus, así como el transporte de animales asintomáticos a diferentes planteles. Entre los fómites se incluyen los vehículos de transporte, equipos, alimento, personal (indumentaria contaminada), y animales silvestres y aves (Dee *et al.*, 2014; Lowe *et al.*, 2014; Bowman *et al.*, 2015).

Posterior a un brote agudo, la presentación clínica desaparece, pero el virus puede permanecer en las maternidades por alguna falla en el sistema de desinfección y bioseguridad; a su vez, puede persistir en las unidades de los cerdos de destete o de los animales de engorde, donde el virus permanece en circulación, causando esporádicos cuadros de diarrea leve y de muy baja mortalidad. En estas condiciones, los lechones recién nacidos que no hayan logrado obtener suficiente inmunidad de sus madres se enfrentarán al virus circulante en la granja y serán infectados. De esta manera ocurrirán brotes epidémicos recurrentes afectando a los animales susceptibles, ocasionando alta mortalidad (Lee, 2015). Los cerdos a término clínicamente sanos sobrevivientes a la infección pueden ser reservorios del virus. La introducción de cerdos de países o regiones donde han ocurrido brotes de la enfermedad es de alto riesgo (Sasaki *et al.*, 2016).

Existe evidencia de la detección de ARN viral en plasma utilizado como aditivo en el alimento (Opriessnig *et al.*, 2014; Pasick *et al.*, 2014), quedando en debate su capacidad infectante. Estudios realizados en la Universidad de Minnesota evidenciaron la baja significancia del riesgo de transmisión de PEDV a través de ingredientes y aditivos alimenticios debido a la baja capacidad del virus a sobrevivir a los procesos térmicos utilizados en la industria como en el renderizado de productos cárnicos e hidrólisis (producción de peptonas). Así mismo, evidenciaron la baja probabilidad de sobrevivencia de PEDV en los procedimientos de secado por pulverización utilizado en la elaboración de aditivos basados en plasma porcino (Foddai *et al.*, 2015; Sampedro *et al.*, 2015); esto sumado a los periodos de almacenamiento comercial utilizados en Norte América y Europa que contribuyen a la inactivación de virus residual o al riesgo de contaminación cruzada (Sampedro *et al.*, 2015).

2.2.4.4. Signos

La diarrea epidémica porcina es una enfermedad entérica de curso agudo y altamente contagiosa, que puede infectar cerdos de cualquier edad, sin embargo, la severidad de la enfermedad es variable y depende fuertemente de la edad de los animales infectados (Song y Park, 2012; Lee, 2015). Generalmente, la enfermedad resulta en una alta morbilidad, que llega al 100%, y una alta mortalidad (80-100%) en lechones lactantes, especialmente aquellos de menores de 10 días de edad (Huang *et al.*, 2013).

Los signos clínicos en los lechones lactantes se caracterizan por una severa enteritis acompañada de cuadros de diarrea acuosa severa, vómitos, seguida de una severa deshidratación, anorexia y emaciación que conducen a la muerte de los animales (Song y Park, 2012; Stevenson *et al.*, 2013; Lv *et al.*, 2016). Los cerdos destetados, de engorde y adultos, suelen superar los signos clínicos y recuperarse aproximadamente una semana después de iniciado el cuadro clínico (Saif *et al.*, 2012), siendo la mortalidad menor del 4% (Stevenson *et al.*, 2013; Lv *et al.*, 2016). La alta susceptibilidad y mayor severidad de la enfermedad de los lechones lactantes se atribuye principalmente a la tasa de regeneración de los enterocitos que es más lenta en los neonatos (5 a 7 días) en comparación con los animales

mayores de 3 semanas de edad (2-3 días), lo cual es dependiente de la cantidad de células madre ubicadas en la cripta intestinal (Jung y Saif, 2015; Jung *et al.*, 2015; Lv *et al.*, 2016).

2.2.4.5. Lesiones

Las lesiones macroscópicas se limitan al nivel gastroentérico y se caracteriza porque los intestinos se observan distendidos y presentan una pared muy delgada, casi transparente (de duodeno a colon), con gran acumulación de contenido amarillento líquido en el lumen intestinal (Debouck *et al.*, 1981; Huang *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2014; Lee, 2015). El estómago suele observarse lleno de leche sin digerir cuajada, posiblemente debido a la reducción del peristaltismo intestinal. Frecuentemente se observa congestión de vasos sanguíneos mesentéricos, ganglios linfáticos mesentéricos edematosos y reducción de vasos linfáticos en las microvellosidades, como un indicador de mala absorción (Puranajeva *et al.*, 2009; Jung y Saif, 2015). A pesar de la severa diarrea, los cerdos infectados presentan leve a moderado apetito en los 3 a 5 días luego del inicio de la diarrea, tiempo posterior se observan anoréxicos, deshidratados, débiles y moribundos (Jung *et al.*, 2014; Lee, 2015).

Las lesiones histológicas que suelen observarse corresponden a una severa enteritis atrófica difusa, con aumento de tamaño de enterocitos con moderada vacuolización y edema subepitelial a nivel de ciego y colon (Jung y Saif, 2015). Durante la infección aguda, se observan enterocitos vacuolados, necrosis y desprendimiento masivo de los enterocitos en la zona apical de las microvellosidades o en toda su extensión, y contracción de la lámina propia subyacente en la cual se observan células apoptóticas (Debouck *et al.*, 1981; Madson *et al.*, 2014; Lee, 2015). La presencia de la descamación epitelial en el yeyuno, que se observa en estos casos clínicos, se debe a la pérdida de producción de proteínas que participan en la adherencia intercelular de los enterocitos sobre todo de las proteínas ocludina zonula 1 (ZO)-1, que afecta las uniones estrechas (tight junctions) y las uniones adherentes (adherens junctions) induciendo a la desorganización con desprendimiento de los enterocitos (Jung *et al.*, 2015) y que facilitarían la permeabilidad bacteriana y una infección secundaria bacteriana que

incrementan el daño de la mucosa intestinal. Las vellosidades atrofiadas frecuentemente se observan fusionadas y mezcladas en un epitelio plano degenerado. En los días 1-3 del inicio de la diarrea, se observa un severo acortamiento de las vellosidades, el cual puede llegar a los dos tercios o menos de su longitud inicial; la extensión depende del estadio de la infección así como de la edad de los lechones (Debouck *et al.*, 1981; Jung *et al.*, 2014; Lee, 2015). Se evidencia la infiltración de células inflamatorias en la lámina propia. Las criptas de Lieberkuhn a nivel de duodeno se observan conservadas. No suelen observarse lesiones en otros órganos como bazo, hígado, pulmón, riñón y ganglios linfáticos asociados a la cavidad oral e intranasal en lechones infectados (Jung y Saif, 2015). Durante el periodo de incubación, previo a la presentación de los signos clínicos, los animales infectados presentan vellosidades de longitud normal pero ya puede observarse la presencia de enterocitos vacuolados hacia una necrosis (Jung *et al.*, 2014; Jung y Saif, 2015).

2.2.5. Diagnóstico

Debido a que PEDV es una agente asociado a diarrea, clínicamente no es posible distinguirlo de otros agentes virales causales de diarrea en porcinos, incluyendo al virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), deltacoronavirus porcino y rotavirus porcino. Por lo tanto, para el diagnóstico, al no poder llevarse a cabo en base a signos clínicos y lesiones histopatológicas, se requiere de un diagnóstico diferencial y diversas pruebas de laboratorio para la identificación de PEDV (Song y Park, 2012; Lv et al, 2016).

Muchas técnicas han sido utilizadas para su detección, como son el aislamiento viral, la prueba de inmunofluorescencia (IF), técnica de inmunohistoquímica (IHQ), hibridación *in situ*, microscopía electrónica directa, ensayo por inmuoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y virus neutralización (VN). Sin embargo, muchas de las técnicas son complejas, toman mucho tiempo en su desarrollo y presentan baja sensibilidad y especificidad (Song y Park, 2012).

2.2.5.1. Aislamiento viral en cultivo celular

PEDV se aísla y propaga adecuadamente en cultivo celular VERO (cultivo de riñón de mono verde africano) en presencia de tripsina. Diversos trabajos han evidenciado diferencias en la aparición del efecto citopático (ECP) en células VERO; por ejemplo, de acuerdo con Hofmann y Wyler (1988), el ECP fue observado desde el primer pasaje en células Vero, a diferencia de lo descrito por Pan *et al.* (2012), el ECP no fue observado sino hasta el pasaje siete a pesar de que el virus era detectado por PCR en los pasajes previos. Estas discrepancias pueden ser atribuidas a la relativa susceptibilidad de las células VERO a las diferentes cepas de PEDV (Pan *et al.*, 2012). Posteriormente se utilizó otra línea de cultivo de riñón de mono verde africano, la línea MARC-145, la cual también permite el pasaje seriado de PEDV (Jung y Saif, 2015).

La presencia de tripsina exógena juega un rol primordial para la entrada y liberación de los viriones en cultivo VERO, facilitando la replicación y diseminación del virus a las células adyacentes. El efecto de la tripsina resulta en la partición de la proteína S en las subunidades S1 y S2, requerido para la fusión y liberación de las células infectadas (Shirato *et al.*, 2011; Wicht *et al.*, 2014). El efecto citopático se describe con la presencia de vacuolización y formación de sincitios (Hoffman y Wyler, 1988; Kim y Lee, 2014; Jung y Saif, 2015).

Diversos trabajos describen la dificultad de la técnica de aislamiento de PEDV en cultivo celular a partir de muestras intestinales o de heces (Chen *et al.*, 2014; Oka *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Lv *et al.*, 2016). Oka *et al.* (2014) reportaron el aislamiento con éxito de 9 de 88 muestras positivas de campo estadounidenses por pasajes seriados mediante cultivo celular VERO suplementadas con tripsina. Estas cepas PEDV mostraron tres perfiles genéticos distintos en la región parcial de la proteína S en base a análisis de la secuencia genómica. Múltiples factores deben afectar la efectividad del aislamiento en cultivo celular, como son el tipo de espécimen, título viral, sustancias inhibidoras en el contenido intestinal, así como factores específicos de las cepas virales, de las líneas celulares Vero y de las condiciones de cultivo (Wang *et al.*, 2015).

2.2.5.2. Pruebas serológicas

Para el diagnóstico serológico se han utilizado diversas técnicas para la detección de anticuerpos contra PEDV, como son Inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA y virus neutralización (VN).

El objetivo radica en evaluar la presencia o ausencia de anticuerpos anti-PEDV en la transferencia por inmunidad pasiva a los lechones. Por lo tanto, la cuantificación de los títulos de anticuerpos neutralizantes contra PEDV, o en especial, contra la proteína S en suero y calostro son necesarios para el adecuado monitoreo de los niveles de inmunidad alcanzados posterior a la inmunización de las marranas. Las pruebas de IFI y ELISA son similares en especificidad pero menos laboriosas y de fácil aplicación, a diferencia de la prueba de VN (Lee, 2015).

Estas técnicas son de utilidad en el monitoreo en lugares endémicos, mediante la determinación del estatus de infección en cerdos desde el destete hasta el acabado. Muchas de los ensayos utilizados actualmente han sido desarrollados en base al virus completo (Hofmann y Wyler, 1990; Oh *et al.*, 2005) o en proteínas virales antigénicas específicas (Ren *et al.*, 2011; Gerber *et al.*, 2014; Lee, 2015). De esta manera, diversos grupos de investigación se encuentran utilizando a la proteína S o su porción S1 como antígeno viral en el diseño de ensayos de ELISA indirecto, así como proteínas S1 recombinantes (Sun *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011). Esta técnica es muy útil, sensible y específica para la detección de anticuerpos IgG e IgA anti-S1 de PEDV. Recientemente, han sido desarrollados dos ensayos de ELISA son utilizados en la detección anti PEDV IgG e IgA en muestras de suero y calostro (Gerber *et al.*, 2014) y anti PEDV IgA en muestras de suero y heces (Gerber *et al.*, 2015).

2.2.5.3. Pruebas moleculares

La detección de ácidos nucleicos a partir de muestras fecales o de contenido intestinal por RT-PCR es la técnica de uso más frecuente hoy en día debido a su simplicidad y rapidez en el diagnóstico de PEDV en comparación con otros métodos (Kim y Chae, 2002).

Se han descrito diversos protocolos de RT-PCR para la detección de PEDV, debido a su gran sensibilidad y especificidad asociados al diseño de cebadores específicos basados generalmente en la amplificación de segmentos de los genes M, N y S (Lv *et al.*, 2015). Así mismo, la técnica ha sido utilizada para diferenciar PEDV de TGEV en diversos protocolos dúplex (Kim *et al.*, 2001). La elaboración de kits comerciales en los países asiáticos, así como en los Estados Unidos, han facilitado su uso durante brotes y epidemias, así como durante el monitoreo durante la aplicación de medidas de control.

Adicionalmente, el secuenciamiento nucleotídico de la región correspondiente al gen S permite determinar el genotipo PEDV que se encuentra circulando en un plantel. La combinación de la técnica de RT-PCR y secuenciamiento del gen S constituyen una herramienta óptima para el monitoreo de diversidad genética entre las cepas PEDV (Lee, 2015).

2.2.5.4. Ensayos de inmunocromatografía

Basados en el uso de anticuerpos monoclonales contra PEDV, la prueba de inmunohistoquímica (IHQ) puede utilizarse tanto en el laboratorio como en el campo. En general posee menor sensibilidad que la técnica de RT-PCR, sin embargo, permite obtener rápidos resultados en 10 minutos. Es por ello que es particularmente útil para tomar medidas de control inmediatas en el campo donde la carga viral en las muestras fecales colectadas de animales enfermos con cuadros agudos de diarrea es muy alta (Saif *et al.*, 2012). Existen kits comerciales utilizados en campo que determinan la presencia de PEDV o dúplex (TGEV y PEDV) (Saif *et al.*, 2012; Song, 2012).

2.2.6. Inmunidad frente a PEDV

El sistema inmune innato conforma la primera línea de defensa ante el proceso de infección viral, donde ocurre la producción inicial de Interferón (IFN) de tipo I (IFN- α/β) y citoquinas proinflamatorias en respuesta al reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos por parte de receptores de

reconocimiento de patrón del hospedero en el establecimiento de un estado antiviral, el cual es altamente efectivo en el control de la infección (Lv *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

El interferón tipo I juega un papel importante en la respuesta inmune antiviral, sin embargo, diversos reportes han evidenciado la habilidad de PEDV en suprimir la respuesta IFN como mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedero (Lv *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Estudios recientes evidencian la participación de diversas proteínas virales en la supresión de la vía de Interferón tipo I, las cuales incluyen nsp1, nsp3, nsp5, nsp7, nsp14, nsp15, nsp16, ORF3, E, M, y N (Lv *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Xing *et al.* (2013) reportaron el efecto antagonista de nsp3 (proteínasa 2 tipo-papaína) en la producción de IFN- β al actuar como una deubiquitinasa (DUB) viral, interfiriendo con las vías de los genes inducibles por ácido retinoico (RIG) y genes estimuladores de IFN. Ding *et al.* (2014) reportaron el efecto supresor de la proteína N sobre el factor regulador de IFN 3 (IRF3) y del factor nuclear κ B (NF- κ B) y antagonizante en la producción de IFN- β . Cao *et al.* (2015) reportaron la inhibición de la inducción de IFN- β mediada por ARN de cadena doble interfiriendo con la actividad IRF3. Zhang *et al.* (2016) reportaron la acción de nsp1 de interrumpir la unión de factores de transcripción de IRF3 y proteínas de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB).

La respuesta inmune innata hacia PEDV varía con la edad del hospedero. Annamalai *et al.* (2015) reportaron la baja frecuencia de células “natural killer” (NK), indetectable actividad NK y menor presencia de células NK productoras de IFN- γ en sangre e intestino de lechones lactantes infectados en comparación con lechones destetados. A su vez, los lechones lactantes infectados presentaron rápidos y marcados incrementos de IFN- α sérico, y reducidos niveles de interleucina-8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) séricos en comparación con lechones destetados. Esta deficiencia en la función de inmunidad innata por parte de las células NK debe contribuir a la severidad de la infección observada en lechones lactantes. Así mismo, se reportó la importancia de la presentación por parte de las células dendríticas, monocíticas e intestinales en el inicio de una respuesta efectiva (Gao *et al.*, 2015).

La importancia de la respuesta humoral radica principalmente en producción de inmunoglobulina A (IgA) secretora, la cual es inducida activamente por la infección de cerdos y marranas con cepas PEDV virulentas como atenuadas, y de esta manera la inmunidad pasiva constituye la principal estrategia de control de PEDV (Langel *et al.*, 2016). Animales expuestos a cepas virulentas producen mayores cantidades de células secretoras de anticuerpos IgA e IgG a los 21 días post infección principalmente en el tejido linfoide asociado a intestinos (GALT), a diferencia de los animales expuestos a cepas atenuadas, donde los niveles detectados de células secretoras de anticuerpos son menores (Langel *et al.*, 2016).

2.2.7. Caracterización genotípica y epidemiología molecular

El análisis genético y filogenético de PEDV utilizando el genoma completo o algunos de sus genes individuales, como el gen S, M, N, E y ORF-3, han sido realizados con el fin de determinar la diversidad y relación de las diversas cepas aisladas a nivel global (Chen *et al.*, 2014). El gen S es frecuentemente utilizado para la evaluación de la diversidad genética de los coronavirus (Chang *et al.*, 2002). Los análisis basados en el gen S completo y el dominio S1 han demostrado ser los que mejor reflejan la diversidad genética observada en el análisis del genoma completo (Lee *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014). De esta manera, el gen de la proteína S, así como su dominio S1, han demostrado ser las secuencias idóneas para las investigaciones en la relación genética y epidemiología molecular de PEDV (Lee *et al.*, 2010; Lee, 2015).

Los estudios filogenéticos basados en el gen S inferido por el método de neighbor-joining indican que genéticamente PEDV se divide en dos genogrupos denominados: genogrupo 1 (G1), referidas como cepas clásicas o históricas de origen europeo y asiático; y genogrupo 2 (G2), referidas como cepas de campo epidémicas o pandémicas (Lee, 2015). A su vez, diversos estudios han permitido determinar los subgrupos, G1a y G1b, así como G2a y G2b, respectivamente (Lee, 2015; Lv *et al.*, 2016).

El subgrupo 1a (G1a) incluye a la cepa prototipo CV777, y demás cepas vacunales históricas y cepas derivadas adaptadas en cultivo celular; las primeras

cepas reportadas en Europa y en países asiáticos, iniciando en Japón en 1982 (Takahashi *et al.*, 1983) y posteriormente descritas en China, Corea del Sur, Tailandia y Vietnam (Kwen *et al.*, 1993; Puranaveja *et al.*, 2009; Duy *et al.*, 2011; Vui *et al.*, 2014). El genogrupo 1b (G1b) comprende nuevas variantes que fueron primero identificadas en China (Li *et al.*, 2012), más tarde en Estados Unidos (Wang *et al.*, 2014) y en Sur Corea (Lee *et al.*, 2014) en 2013 y 2014 respectivamente, y posteriormente en países europeos (Lee, 2015).

El genogrupo 2 (G2) contiene cepas históricas Coreanas y las cepas de campo más recientes prevalentes globalmente distribuidas. El genogrupo 2a (G2a) es responsable por los más recientes brotes epidémicos locales en Asia desde el año 2010, prevalentes en China (Lee, 2015), Taiwan (Lin *et al.*, 2014), Corea del Sur (Lee y Lee, 2014) y Estados Unidos (Wang *et al.*, 2014). El genogrupo 2b (G2b), otro genotipo prevalente en China y Corea, y causante de los brotes en Vietnam desde el 2009 (Vui *et al.*, 2014).

La cepa PEDV detectada por primera vez en Estados Unidos en abril de 2013 fue causante de severos cuadros clínicos, y desde entonces se dispersó rápidamente por el país; estas cepas inicialmente denominadas como PEDV US clásicas, correspondieron al genogrupo G2a (Vlasova *et al.*, 2014). Diversos trabajos evidenciaron la estrecha relación con las cepas chinas AH2012 (GenBank: KC210145) y CH/ZMDZY/11 (GenBank KC196276), mediante el análisis del genoma completo y de la proteína S respectivamente, sugiriendo su origen en aquellas cepas e incluso por una posible recombinación de ambas (Vlasova *et al.*, 2014; Lv *et al.*, 2016). Posteriormente la cepa OH851 estadounidense detectada en enero de 2014, reveló diferencias con respecto a las cepas iniciales norteamericanas. El análisis de secuencias evidenció mayor relación a la cepa prototipo CV777 y en particular a la cepa china HBQX/2010, ubicándose en el genogrupo G1b (Lv *et al.*, 2016).

Las diferencias sustanciales entre ambos genogrupos se observan en la presentación deleciones de 1, 11 y 3 nucleótidos en las posiciones 167, 176-186 y 416-418 respectivamente y una inserción de 6 nucleótidos en la posición 474-475 del gen S en las cepas G1 con respecto a G2, es por ello la denominación de S-INDEL de las cepas G1 (Vlasova *et al.*, 2014).

2.2.8. Prevención y control

Una de las primeras estrategias de manejo utilizadas para el control de PED se basó en el “Feedback”, es decir, exposición controlada de todas las madres a virus autógenos, en el cual se expone a la totalidad de hembras a material infeccioso como heces y tejido intestinal colectado de lechones infectados, con la intención de estimular una inmunidad activa contra PEDV (Langel *et al.*, 2016). El objetivo de este procedimiento es desarrollar inmunidad para PEDV en la cerda, la que será transferida a sus lechones mediante el calostro y la leche, protegiéndolos en el periodo de vida en el que son más vulnerables (Langel *et al.*, 2016). Cabe mencionar que esta técnica tiene buenos resultados ya que la incidencia de la enfermedad clínica disminuye en gran escala en el tiempo, sin embargo, el Feedback no es 100% efectivo (Goede y Morrison, 2016; Langel *et al.*, 2016).

La vacunación de las madres ha sido una herramienta fundamental en el control y erradicación de la enfermedad durante brotes epidémicos y endémicos. Mediante esta estrategia los lechones son protegidos por la transferencia de anticuerpos maternos a través del calostro y leche de sus madres inmunizadas. El desarrollo de vacunas se llevó a cabo tras los brotes en los países asiáticos, los cuales fueron más devastadores que en los países europeos donde se originó. En China se utilizó la cepa CV777 atenuada o inactivada, que fue utilizada rutinariamente. En Japón, la cepa 83P-5 atenuada adaptada a cultivo celular se utilizó como una vacuna viva de aplicación intramuscular (P-5V) (Sato *et al.*, 2011). Cepas virulentas surcoreanas atenuadas en cultivo celular, SM-98 y DR-13, han sido utilizadas como vacuna de virus vivo o muerto de aplicación intramuscular y como vacuna viva oral, respectivamente (Kweon *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2007). Aunque estas vacunas han demostrado protección bajo condiciones experimentales, su efectividad en campo aún es materia de debate. Su uso en las hembras bajo diferentes protocolos de vacunación en campo ha conferido buenos resultados con títulos de anticuerpo neutralizantes altos en calostro y leche e incrementando la tasa de supervivencia de lechones expuestos a cepas virulentas a valores superiores del 80% (Lee, 2015). Cabe mencionar que

ninguna de todas las vacunas, experimentales y/o disponibles en el mercado, reducen significativamente la presentación de diarrea y con ello la diseminación viral a través de las heces. La protección contra la enfermedad entérica depende principalmente de la presencia de anticuerpos secretorios IgA en la mucosa. De esta manera, para determinar la eficacia de la vacunación, ésta debe mantener altos niveles de anticuerpos neutralizantes específicos presentes en el suero y calostro de las madres inmunizadas (Song *et al.*, 2007; Lee, 2015).

Adicionalmente a la vacunación deben tenerse en cuenta diversos factores para asegurar la adecuada transferencia de inmunidad de las madres a los lechones. Las condiciones de salud y procedimientos sanitarios de las madres lactantes deben monitorearse exhaustivamente para eliminar factores potenciales que afecten negativamente la performance de la lactación, como por ejemplo la ocurrencia de casos de mastitis o agalactia. Así mismo, la inmunización activa de los animales desde el destete hasta el acabado es necesaria para el control de la enfermedad en zonas endémicas, debido a que al destete, los animales automáticamente pierden su fuente de inmunidad lactogénica volviéndose vulnerables al agente que puede permanecer circulante en la granja (Saif *et al.*, 2012).

Las vacunas comerciales reportadas, principalmente en países asiáticos, incluyen vacunas virus vivo atenuado, vacunas inactivadas, multivalentes (en conjunto con TGEV y Rotavirus), así mismo, diversos trabajos reportan buenos resultados mediante el uso de vacunas orales (Song y Park, 2012; Song, *et al.*, 2015). Sin embargo, diversas publicaciones cuestionan la eficacia y seguridad de las vacunas utilizadas en Asia, debido a la dificultad en la realización de una óptima evaluación mediante el análisis de diversos factores como los anticuerpos neutralizantes séricos, severidad de la diarrea, mortalidad posterior al desafío, características de las enfermedades de mucosas, etc. (Tian *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2015).

La moderada efectividad de las vacunas actuales se asocia a las diferencias antigénica, genética y filogenética entre las cepas vacunales y la diversidad de cepas de campo (Oh *et al.*, 2014; Lee, 2015). El aislamiento de una cepa PEDV que sea fenotípica y genotípicamente idéntica a las cepas de campo causantes de

cuadros epidémicos es crucial para el desarrollo de vacunas efectivas. De esta manera, ante el aislamiento de ciertas cepas en estados Unidos, se permitió la elaboración de una vacuna inactivada, la cual hoy en día se utiliza y se encuentra disponible en el mercado estadounidense (Lee, 2015).

2.2.9. Importancia del análisis de proteína S

Debido a su importante rol en la unión y entrada a la célula, el gen de la proteína S ha sido ampliamente estudiado y caracterizado, y se ha demostrado que contiene epítopes asociados a anticuerpos neutralizantes (Chang *et al.*, 2002; Temeeyasen *et al.*, 2014). Diversas investigaciones han evidenciado y demostrado el alto grado de diversidad genética en el gen de la glicoproteína S de las diversas cepas aisladas de coronavirus, por lo que se considera un gen apropiado para el análisis de relación genética, que permitan el desarrollo de técnicas de diagnóstico y de vacunas efectivas (Lee, 2015; Jarvis *et al.*, 2016).

Diversos estudios revelan que el análisis parcial del gen S, el dominio S1 y el dominio N-terminal S1 constituyen una herramienta muy útil para realizar el estudio de diversidad genética, ya que contienen los mayores sitios de variación y región del epítipo, guardando gran concordancia con el análisis del genoma completo (Lee *et al.*, 2010;). Las regiones restantes del gen S, como son la región C-terminal S1 y la región completa S2, comparten una muy alta identidad entre las diversas cepas globales (Vlasova *et al.*, 2014). De igual manera, el análisis de los genes ORF3, E, M y N, no revelan mayor diferenciación entre cepas globales.

Son esenciales mayores estudios de esta estructura para entender la relación genética entre las cepas, así como su diversidad, el estatus epidemiológico en campo, y la asociación entre mutaciones genéticas y función viral (Song y Park, 2012; Temeeyasen *et al.*, 2014; Jarvis *et al.*, 2016).

III. Materiales y métodos

3.1. Lugar de ejecución y periodo de ejecución

El trabajo se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección de Virología y Unidad de Diagnóstico Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria, de la UNMSM, con sede en Lima, Perú.

3.2. Selección de muestras

Para el presente estudio se utilizaron muestras que fueron remitidas al laboratorio y fueron diagnosticadas como positivas por inmunocromatografía y RT-PCR en tiempo real desde su emergencia en el año 2013, de las cuales se preseleccionaron 30 muestras correspondientes a contenido intestinal e hisopados rectales de lechones menores de 3 semanas de edad cuya historia clínica describió cuadros clínicos entéricos compatibles con PED, como la presencia de diarrea o heces acuosas, vómitos, deshidratación severa, además de presentar altos índices de morbilidad y mortalidad en sus respectivos planteles. Las 30 muestras se eligieron teniendo como criterio de selección el haber presentado un Ct menor a 22 en la prueba de RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico, asegurando así la presencia de una mayor carga viral (Cuadro 1).

Las muestras provinieron de granjas tecnificadas y semitecnificadas del norte, sur, sureste y noroeste de la provincia de Lima y fueron remitidas al laboratorio desde setiembre del 2013 a diciembre del 2015. Éstas fueron remitidas desde las diferentes granjas conservadas en temperatura de refrigeración (4-8°C) durante su transporte, consistiendo en muestras de heces líquidas, intestinos ligados e hisopados rectales. Así mismo, se obtuvieron muestras provenientes de lechones de primeras semanas de vida (1-3 semanas de edad), que fueron llevados al Laboratorio de Embriología, Histología y Patología Veterinaria de la UNMSM,

donde fueron evaluados y llevándose a cabo la necropsia, se colectaron porciones de intestino delgado (yeyuno, 10cm), de los cuales se recuperó el contenido intestinal, así como muestras para el análisis histopatológico.

Cuadro 1. Información de las 30 muestras positivas a PEDV preseleccionadas por cada evento ocurrido en el periodo 2013 a 2015. Lima – Perú.

N°	Año	Id. cepa	Fecha de colección	Id. Granja	Región en Lima	Tipo de espécimen	Resultados RT-PCR tiempo real	
							Ct	Tm (°C)
1	2013	L01	22/07/2013	A	Sur	Contenido intestinal	18.283	77.7
2		L02	05/09/2013	B	Sur	Contenido intestinal	20.699	77.4
3		L03	17/09/2013	C	Noroeste	Contenido intestinal	20.689	77.4
4		L04	24/09/2013	D	Sur	Contenido intestinal	17.827	77.4
5		L05	30/09/2013	A	Sur	Contenido intestinal	17.892	77.7
6		L06	04/10/2013	A	Sur	Contenido intestinal	16.000	77.4
7		L07	11/10/2013	C	Noroeste	Contenido intestinal	19.085	77.7
8		L08	28/10/2013	B	Sur	Contenido intestinal	17.595	77.7
9	2014	L09	05/12/2013	B	Sur	Contenido intestinal	13.696	77.1
10		L10	25/02/2014	E	Sureste	Contenido intestinal	20.553	77.4
11		L11	22/09/2014	F	Norte	Contenido intestinal	20.850	77.1
12		L12	04/12/2014	F	Norte	Hisopado rectal	21.207	77.7
13		L13	22/12/2014	A	Sur	Hisopado rectal	20.800	77
14		L14	20/01/2015	F	Norte	Hisopado rectal	21.500	76.6
15		L15	24/01/2015	F	Norte	Hisopado rectal	19.130	76.6
16		L16	06/02/2015	A	Sur	Hisopado rectal	10.500	76.6
17	2015	L17	12/03/2015	F	Norte	Hisopado rectal	13.400	76.6
18		L18	30/03/2015	F	Norte	Hisopado rectal	20.970	76.6
19		L19	07/04/2015	F	Norte	Hisopado rectal	22.500	76.6
20		L20	07/04/2015	F	Norte	Hisopado rectal	20.500	76.9
21		L21	07/04/2015	F	Norte	Hisopado rectal	18.000	76.9
22		L22	07/04/2015	G	Norte	Hisopado rectal	20.900	76.6
23		L23	09/04/2015	G	Norte	Hisopado rectal	20.800	76.9
24		L24	15/04/2015	F	Norte	Hisopado rectal	18.500	76.6
25		L25	29/05/2015	F	Norte	Hisopado rectal	24.300	76.6
26		L26	12/06/2015	H	Norte	Hisopado rectal	23.420	76.6
27		L27	03/08/2015	A	Sur	Hisopado rectal	18.200	76.9
28		L28	03/08/2015	A	Sur	Hisopado rectal	18.650	76.9
29		L29	07/08/2015	A	Sur	Hisopado rectal	21.720	76.6
30		L30	14/09/2015	H	Norte	Hisopado rectal	23.300	76.6

*Id: identificación de la muestra

3.3. Metodología

3.3.1. Procesamiento de las muestras

En el procesamiento inicial, las muestras de contenido intestinal (volumen aproximado de 5ml) fueron diluidas en PBS pH 7.4 a fin de lograr una suspensión aproximada del 30%. Posteriormente se homogenizaron en vórtex y centrifugaron a 1,500 g por 7 minutos, colectándose el sobrenadante, pasándolo a través de filtros de jeringa de 0.45µm por 20mm. Una vez filtradas, las muestras fueron identificadas y almacenadas a -70°C hasta su posterior utilización.

3.3.2. Inmunocromatografía

Para el diagnóstico rápido de la presencia del virus PED, se realizó la prueba de inmunocromatografía utilizando los kits Anigen Rapid PED Ag Test y Anigen Rapid TGE/PED Ag Test (Bionote, Korea), siguiendo las instrucciones del fabricante, los cuales poseen un 98% de especificidad y 92% de sensibilidad. Esta metodología determina presencia viral a partir de las muestras de contenido intestinal, y descartando la presencia del virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV). Las muestras que resultaron positivas a PEDV se conservaron a -70°C hasta su posterior confirmación por RT-PCR en tiempo real.

3.3.3. Confirmación por RT-PCR en tiempo real

3.3.3.1. Extracción de ARN

La extracción y purificación de ARN se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del kit comercial “QIAamp Viral RNA Mini Kit” (Qiagen, USA), donde las muestras fueron sometidas a un proceso de lisis y purificación mediante el uso de membranas de sílica y una serie de lavados, para finalmente obtener ARN eluido en 60ul de agua libre de nucleasas. El producto obtenido fue alicuotado y conservado a -70°C hasta su utilización (anexo 1).

3.3.3.2. Prueba de RT-PCR en tiempo real

Para la confirmación de la presencia viral se llevó a cabo la técnica de RT-PCR en tiempo real en un paso, mediante el kit comercial GoTaq 1-Step RT-qPCR System (Promega, USA) que utiliza Sybr Green I como fluoróforo intercalante de cadenas dobles de ADN, y utilizando el termociclador MJ Research PTC-200 adosado al lector de fluorescencia Chrome 4 (BioRad, USA).

Se utilizó el protocolo previamente estandarizado por el Laboratorio en una prueba dúplex que identifica al virus de la Diarrea Epidémica Porcina (PEDV) y virus de la Gastroenteritis Transmisible (TGEV), utilizando cebadores específicos descritos por Wang *et al.*, 2014 y Kwon *et al.*, 2013. Los cebadores correspondientes a PEDV reconocen un segmento conservado de 101 bases nucleotídicas del gen que codifica el ORF-3, siendo las secuencias: Forward 5'-GCACTTATTGGCAGGCTTTGT-3' y Reverse 5'-CCATTGAGAAAAGAAAGTGTCGTAG-3'. Con respecto a TGEV, los cebadores utilizados reconocen un segmento conservado de 109 bases nucleotídicas del gen que codifica la proteína S, siendo las secuencias: Forward 5'-GCTTGATGAATTGAGTGCTGATG-3' y Reverse 5'-CCTAACCTCGGCTTGTCTGG-3'.

La proporción de los insumos para un volumen de reacción de 20ul fue la siguiente:

- GoTaq® qPCR Master Mix, 2X	10µl
- Cebador PEDV Forward (10uM)	1µl
- Cebador PEDV Reverse (10uM)	1µl
- Cebador TGEV Forward (10uM)	1µl
- Cebador TGEV Reverse (10uM)	1µl
- GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR, 50X	0.4µl
- Agua libre de nucleasas	3.6µl

Luego de preparada la mezcla, se homogenizó por vórtex de 2 a 3 segundos. Se dispensó 18µl de la mezcla en tubos de PCR tiempo real y se añadió 2µl de ARN (muestras y controles). Los tubos fueron sellados y llevados al termociclador y con el siguiente protocolo de temperatura:

- 42°C por 15 minutos (Transcripción reversa)
- 95°C por 10 minutos (inactivación de RT y activación de ADN polimerasa)
- 40 ciclos de:
 - 95°C por 10 segundos (denaturación)
 - 60°C por 30 segundos (hibridación)
 - 72°C por 30 segundos (extensión)
- Temperatura de disociación: 65 a 95°C, con incremento de 0.3°C por 5 segundos.

Se utilizó como control positivo de PEDV una secuencia de ADN complementario (ADNc) cedida por el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria) del Perú proveniente de USDA-APHIS y de TGEV, la cepa Holland obtenido del Laboratorio SVANOVA, Suecia; como controles negativos se utilizaron cepas de virus que afectan a porcinos con genoma ARN, el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) (ADN complementario del genotipo europeo donado por la Universidad de Zaragoza- España) como virus relacionado al orden viral, y virus de la peste porcina clásica (Cepa Allfort/187, genotipo 1.1) donado por el Canadian Food Inspection Agency, como virus no relacionado. Todas las cepas control fueron procesadas mediante las metodologías de extracción de ARN y retro transcripción descritas anteriormente.

Cabe mencionar que para el diagnóstico por RT-PCR en tiempo real, se considera como positiva a PEDV toda muestra que posea un valor de Ct (ciclo threshold) menor o igual a 35, y con un valor de Tm (temperatura de disociación o Melting) de $77.2 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ (76.9-77.5°C).

3.3.4. Amplificación del dominio S1 por RT-PCR punto final

Las muestras positivas a RT-PCR en tiempo real seleccionadas fueron sometidas a la técnica de RT-PCR punto final en dos pasos para la amplificación del dominio S1 del gen de la espícula o S (spike), acorde al protocolo del Laboratorio de Investigación de Enfermedad Animal y Diagnóstico de la Universidad de Dakota del Sur (VBSD-ADRDL, 2014).

3.3.4.1. Extracción de ARN

Cabe mencionar que se llevó a cabo una nueva extracción de ARN a partir del espécimen inicial, seleccionado como positivo mediante la confirmación por RT-PCR en tiempo real. Esto debido a la sensibilidad de las cadenas simples de ARN a la degradación a lo largo del tiempo. Se realizó este procedimiento mediante la metodología de extracción de ARN descrita pasos atrás (anexo 1).

3.3.4.2. Síntesis de ADN complementario

Utilizando el kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, USA), las muestras fueron sometidas a retro-transcripción para la generación de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN previamente extraído.

La metodología utilizada corresponde a un proceso de RT-PCR en punto final en el cual se preparó la mezcla de reacción en volumen 20µl acorde a las indicaciones del fabricante.

Se realizó una primera mezcla del ARN de la muestra con los cebadores a utilizarse provenientes del kit, con un volumen total de 5µl, en la siguiente proporción:

- | | |
|---------------------------------------|-----|
| - ARN experimental | 2µl |
| - Cebadores (Hexámeros al azar) 0.5ug | 1µl |
| - Agua libre de nucleasas | 2µl |

Esta mezcla fue preparada en tubos de PCR de 0.2ml y sometida a 70°C durante 5 minutos como paso denaturante de las cadenas de ARN de las muestras y cebadores utilizados. Posteriormente se mantuvieron en hielo por 5 minutos.

Se preparó la mezcla de reacción de retrotranscripción en un volumen de 15ul por muestra, acorde a las siguientes proporciones y en el orden indicado:

- | | |
|--|-----|
| - Agua libre de nucleasas | 6μl |
| - GoScript™ 5X Reaction Buffer | 4μl |
| - MgCl ₂ (25mM) | 2μl |
| - PCR Nucleotid Mix (0.5mM cada nucleótido) | 1μl |
| - Recombinante RNasin Ribonuclease Inhibitor | 1μl |
| - GoScript™ Reverse Transcriptase | 1μl |

Se dispensó 15ul de la mezcla de retrotranscripción a cada tubo de reacción previamente preparado con ARN de las muestras, completándose un volumen de reacción de 20ul. Posteriormente fueron sometidas al siguiente protocolo de temperatura:

- 25°C por 05 minutos (hibridación)
- 42°C por 01 hora (extensión)
- 70°C por 15 minutos (inactivación de la enzima retrotranscriptasa)

Posteriormente, los productos de ADNc (ADN complementario) fueron conservados a -70°C hasta su utilización.

A partir de esta síntesis se realizaron los múltiples procesos de PCR en punto final para la amplificación del dominio S1 del gen S para cada muestra.

3.3.4.3. Amplificación del dominio S1 por PCR

Se utilizó el kit comercial GoTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, trabajando en volumen de reacción de 50µl. La proporción de reactivos fue la siguiente:

- GoTaq Colorless Master Mix 2x	25µl
- Cebador PEDV Forward (10uM)	4µl
- Cebador PEDV Reverse (10uM)	4µl
- Agua libre de nucleasas	14µl

Se dispensó 47µl de la mezcla en tubos de PCR de 0.2ml y posteriormente se añadió 3µl de ADNc correspondiente a cada muestra. Posteriormente fueron sometidas al siguiente protocolo de temperatura:

- 94°C por 02 minutos (activación de ADN polimerasa)
- 40 ciclos de:
 - 94°C por 30 segundos (denaturación)
 - 58°C por 30 segundos (hibridación)
 - 72°C por 60 segundos (extensión)
- 72°C por 10 minutos (extensión final)
- Mantener a 8°C

El procedimiento de PCR utilizado es una adaptación del protocolo desarrollado por el Laboratorio de Investigación de Enfermedad Animal y Diagnóstico de la Universidad de Dakota del Sur (VBSD-ADRDL, 2014), el cual utiliza cebadores específicos para la caracterización genotípica de PEDV (Cuadro 2). Estos cebadores específicos permiten la construcción del dominio S1 del gen S del virus PED, mediante su síntesis en cuatro secciones cuyos extremos se superponen y empalman abarcando toda su extensión (2,370 pares de bases). Estos cebadores fueron diseñados para la realización del secuenciamiento por el método de Sanger automatizado (Dee *et al.*, 2014; VBSD-ADRDL, 2014).

Cuadro 2. Cebadores específicos para el secuenciamiento del dominio S1 de PEDV. Los cebadores amplifican la secuencia del dominio S1 de PEDV mediante cuatro segmentos para el secuenciamiento (VBSD-ADRDL, 2014).

Segmento	Producto (pb)	Sentido	Secuencia (5'-3')
S1 - seg1	670	Fw	ATG ARG TCT TTA AYY TAC TTC TGG
		Rv	CAT CCT CAC CWG CAC TAG TAA C
S1 - seg2	678	Fw	GTT GTG CTA TGC AAT ATG TTT AY
		Rv	TGA AAT TAA TTG TGA CAG CAT C
S1 - seg3	565	Fw	TTG TCA TCA CCA AGT AYG GTG
		Rv	CTA AAA GAC AGG TAA TCA TTA ACA G
S1 - seg4	745	Fw	CTG TGT TGA CAC TAG ACA ATT TAC
		Rv	CAT ACT AAA GTT GGT GGG AAT AC

3.3.4.4. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X, utilizando bromuro de etidio y visualizados a través de un transiluminador UV y utilizando marcadores de peso molecular de Promega, USA (100bp DNA Ladder).

Se realizó la mezcla en la proporción de 10µl de marcador y muestras de ADNc con 1µl de buffer de carga y 1.2µl de bromuro de etidio (EtBr) preparado en concentración de 20mg/ml. Se corrieron en campo eléctrico de 90V durante una hora a fin de observarse las bandas en el tamaño esperado (cuadro 2).

3.3.4.5. Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR correspondientes (bandas del tamaño esperado, cuadro N°1) fueron colectados por escisión del gel de agarosa con hoja de bisturí y purificados a partir del gel seccionado mediante el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante (Anexo 2).

Posteriormente, los productos purificados fueron cuantificados mediante fluorometría utilizando el equipo Qubit 1.0 (Invitrogen, Life Technologies, USA) y el kit comercial Qubit® dsDNA HS Assay Kit, siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.3.5. Secuenciamiento

Los productos de PCR fueron preparados acorde a las indicaciones en volumen y concentración requeridas por Macrogen Inc. para la realización del secuenciamiento por el método de Sanger automatizado de cada uno de los cuatro (04) segmentos correspondientes a cada cepa.

Los productos purificados obtenidos fueron colocados en tubos de microcentrífuga de 1.5ml en volumen de 25µl. El rango de concentración fue de 23.3-33.0ng/µl. Los productos fueron enviados a temperatura ambiente a Macrogen Inc., con sede en Seúl, República de Corea, donde fueron sometidas a secuenciamiento bidireccional, para lo cual también fueron enviados los cebadores utilizados para su síntesis (forward y reverse).

Los resultados fueron recibidos en archivo del software Chromas Lite 2.1.1, en donde se pudo visualizar cada lectura del secuenciamiento en gráficos (cromatogramas).

3.3.6. Análisis de secuencia nucleotídicas y análisis filogenético

Las secuencias correspondientes al dominio S1 de las cepas PEDV detectadas en el estudio fueron utilizadas de forma independiente en los alineamientos y análisis filogenético. Los cromatogramas de las secuencias de cada muestra fueron analizados y empalmados mediante los softwares Chromas Lite v2.1.1 y EditSeq v7.0.0 de Lasergene, DNASTAR, respectivamente, llevándose a cabo estos procedimientos de forma manual, realizando inicialmente la edición de los cromatogramas, retirando los extremos que suelen ser indefinidos (región de los cebadores, de aproximadamente 20 nucleótidos). Posteriormente

fue editado el resto de la secuencia (ventana entre los cebadores), observándose, en su mayor extensión, picos definidos correspondientes a los diferentes nucleótidos. El empalme de las secuencias, así mismo, se realizó de forma manual, al detectar las zonas complementarias en los extremos subsecuentes.

El alineamiento de secuencias múltiples fue realizado utilizando el método ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) mediante el software MegAlign 7.0 de Lasergene DNASTAR (Clewley y Arnold, 1997). La edición se llevó a cabo utilizando dos secuencias como base de comparación, las cepas referenciales USA/IA/2013/4937 (KM975736.1) y USA/Iowa106/2013 (KJ645695.1). El análisis genético se realizó mediante los software MegAlign 7.0 y MEGA 6.05 (Tamura *et al.*, 2013) y el porcentaje de identidad fue analizado mediante los mismos softwares. El árbol filogenético fue construido a partir de las secuencias alineadas mediante el método Neighbor-joining (NJ) utilizando el modelo de distancia Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980), y análisis bootstrap de 1000 réplicas para la determinación del valor de fiabilidad porcentual en cada nodo interno del árbol (Chen *et al.*, 2013), y de esta manera representar gráficamente las relaciones y patrones de distancia genética entre las diferentes cepas analizadas, comparando el dominio S1 del gen S de las cepas PEDV peruanas con diversas cepas de referencia correspondientes a Estados Unidos, Canadá, México, Ecuador, Colombia (continente americano), así como cepas chinas y coreanas (continente asiático), parte de las cepas disponibles en GeneBank (Anexo 3). Cabe mencionar que las cepas americanas utilizadas corresponden a las reportadas en los años 2013-2014, periodo que comprende la emergencia y diseminación del agente en los Estados Unidos y demás países americanos, incluido Perú. Para el análisis nucleotídico y árbol filogenético se eligieron cepas representativas que tenían distintas distancias genéticas clarificando mejor el diseño del árbol filogenético.

IV. Resultados

4.1. Descripción de signos clínicos y hallazgos de necropsia

Los signos clínicos descritos corresponden a los observados en los lechones que fueron enviados vivos al Laboratorio de Embriología, Histología y Patología Veterinaria de la UNMSM para la realización de la necropsia correspondiente. Estos lechones provenían de granjas afectadas con cuadros de diarrea aguda con alta tasa de morbilidad y mortalidad en lechones lactantes de aproximadamente 100 y 85%, respectivamente.

La historia clínica describió brotes abruptos de cuadros diarreicos en lechones de diferentes edades, siendo los más afectados los lechones menores de 20 días de edad, los cuales rápidamente se deprimieron, observándose inapetencia, deshidratación y debilidad. La mortalidad se observó a partir del segundo día de iniciada la manifestación de signos clínicos. Con respecto a las madres, hubo leve presencia de diarrea.

En la evaluación clínica de los lechones, se observó marcada depresión, deshidratación y emaciación. Los animales se encontraron muy débiles, incapaces de mantenerse en pie. La piel se observó deshidratada, de aspecto rugoso y poco flexible y las mucosas pálidas. Presentaron restos de heces secas alrededor de la zona perineal; así mismo, se pudo observar diarrea constante acuosa o pastosa de coloración blanquecino-amarillenta (Fig. 3).

En la necropsia, se pudo observar palidez general y emaciación por ausencia de grasa subcutánea. Se observaron intestinos delgados distendidos con contenido acuoso de coloración amarillento. Las paredes intestinales se encontraron delgadas y casi traslúcidas, con vasos sanguíneos mesentéricos congestionados. El estómago de los lechones se observó distendido con contenido correspondiente a leche sin digerir coagulada ocupando todo el interior gástrico (Fig. 4).

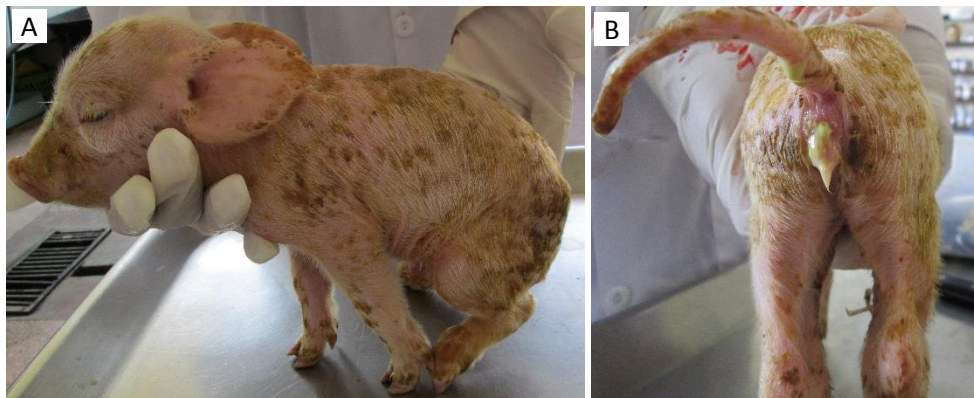


Figura 3. Signos clínicos de PED observados en lechones. A: Se observa un lechón deprimido, débil y emaciado, con rastro de heces líquidas alrededor de la zona perianal. **B:** Presencia de heces líquidas de coloración amarillenta en zona perianal.

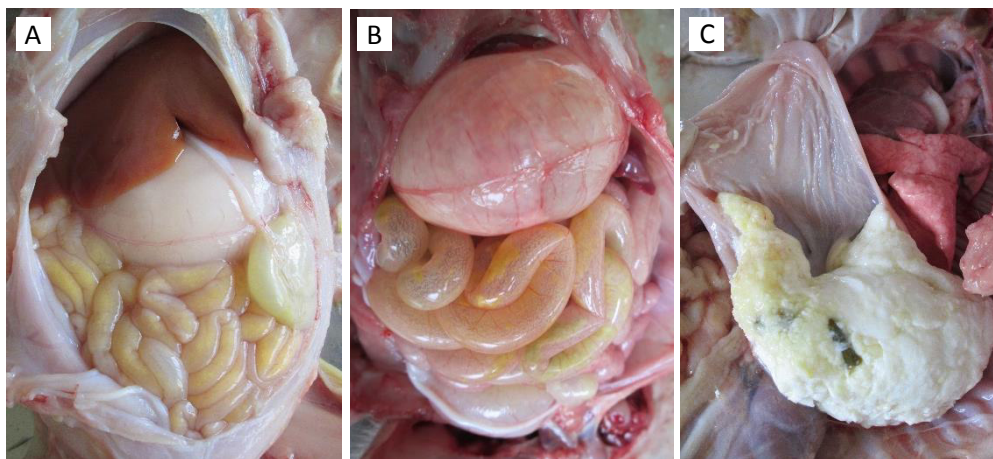


Figura 4. Hallazgos de necropsia de lechones afectados. A y B: Se observa distensión en intestino delgado cuyas paredes se encuentran delgadas y traslúcidas. El contenido acuoso de coloración amarillenta se observa a través de las paredes. Distensión del estómago con contenido sin digerir. **C:** Contenido gástrico de leche sin digerir coagulada.

A nivel microscópico se pudo observar una severa yeyunitis caracterizada por descamación del epitelio entérico, con evidente acortamiento de las vellosidades. La severa atrofia de las vellosidades se caracteriza por descamación de las células epiteliales en las zonas laterales y apicales; y condensación de la lámina propia. Se observa aumento del tamaño (hinchazón) de los enterocitos, con citoplasma granular y presencia de vacuolas acidofílicas. Así mismo, se observaron enterocitos formando sincitios multinucleados en algunos campos (Fig. 5).

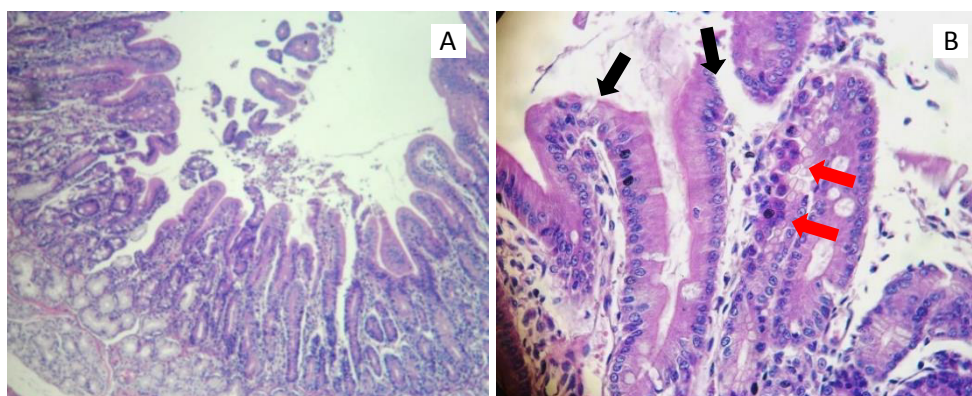


Figura 5. Hallazgos histopatológicos en intestino delgado de lechones afectados. **A:** Se observa el acortamiento de las vellosidades intestinales, descamación del epitelio e infiltrado linfóide en la lámina propia. **B:** El desprendimiento epitelial (flechas negras) puede observarse a nivel apical y lateral de las vellosidades. Se observa agrandamiento de células epiteliales en las zonas afectadas y la presencia de sincitios multinucleados (flechas rojas).

4.2. Inmunocromatografía

Las 30 muestras preseleccionadas resultaron positivas a la prueba de inmunocromatografía, con diferentes intensidades en la banda “tratamiento” (Fig. 6), las cuales fueron posteriormente confirmadas por RT-PCR en tiempo real.

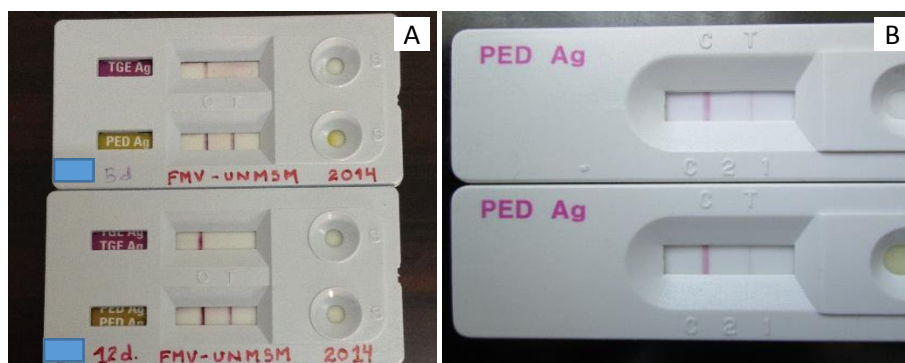


Figura 6. Resultados de pruebas de Inmunocromatografía. Se observan resultados positivos de muestras de contenido intestinal empleando dos kits comerciales. **A:** kit de detección dual para TGEV y PEDV, donde se observan muestras positivas a PEDV y negativas a TGEV (Anigen Rapid TGE/PED Ag Test - Bionote, Korea). **B:** kit de detección de PEDV, donde se observan muestras positivas (Anigen Rapid PED Ag Test - Bionote, Korea).

4.3. Confirmación por RT-PCR en tiempo real

Las 30 muestras que resultaron positivas a inmunocromatografía fueron confirmadas como PEDV por RT-PCR en tiempo real en una prueba dúplex que diferencia PEDV y TGEV. Ellas presentaron amplificación de un producto específico, observándose diversos valores Ct (ciclo “Threshold” o ciclo umbral) de 15.3 a 38.6. La especificidad se definió por el valor de Tm (temperatura de disociación o “Temperatura de Melting”), donde las muestras positivas evidenciaron un valor promedio de Tm de 77.6°C. (Fig. 7 y fig. 8).

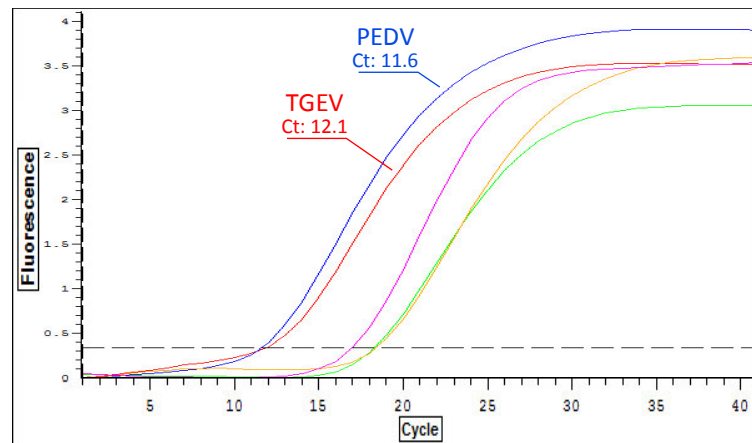


Figura 7. Curva de amplificación de la prueba de RT-PCR en tiempo real para la confirmación de la presencia de PEDV. Se observan los controles PEDV (azul) y TGEV (rojo) con valor Ct de 11.6 y 12.1 respectivamente. Las muestras de campo incluidas en el gráfico (verde, amarillo y rosado) presentan valores Ct mayores a los controles. Software Opticon Monitor v3.0.

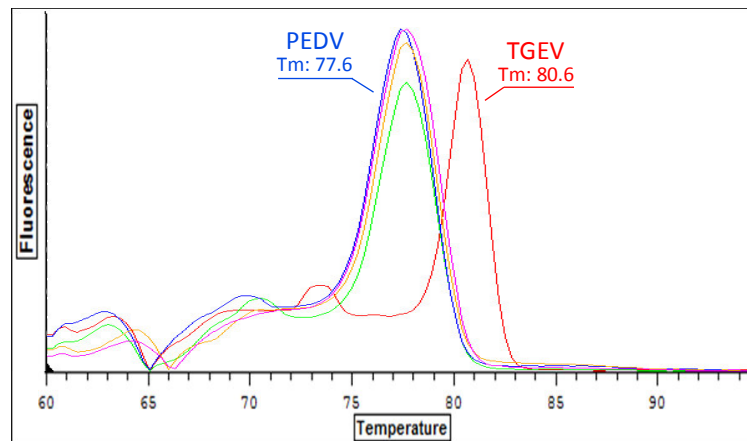


Figura 8. Temperatura de Melting (Tm) de los productos amplificados en la prueba de RT-PCR en tiempo real para la confirmación de la presencia de PEDV. Se observa la derivada de la curva de disociación de los productos correspondientes a los controles PEDV (azul) y TGEV (rojo) con valor Tm de 77.6 y 80.6 °C respectivamente. Dichos valores determinan la especificidad del producto. Las muestras de campo incluidas en el gráfico (verde, amarillo y rosado) presentan valores Tm de 77.6 y son consideradas PEDV positivas. Software Opticon Monitor v3.0.

De las 30 muestras se seleccionaron 11 en base a un Ct bajo (menor a 24), con la finalidad de obtener mayor carga viral para el secuenciamiento de cepas. Las 11 muestras corresponden a muestras de contenido intestinal de la zona norte (n=1), noreste (n=2), sur (n=7) y sureste (n=1) de la provincia de Lima (Cuadro 3).

Cuadro 3. Información de las 11 muestras positivas a PEDV seleccionadas para el desarrollo de la metodología de secuenciamiento del dominio S1.

Nº	Año	Id	Fecha de colección	Id Granja	Región en Lima	Tipo de espécimen	Resultados RT-PCR en tiempo real	
							Ct	Tm
1	2013	L01	22/07/2013	A	Sur	Contenido intestinal	20.019	77.6
2		L02	05/09/2013	B	Sur	Contenido intestinal	20.922	77.6
3		L03	17/09/2013	C	Noroeste	Contenido intestinal	22.897	77.6
4		L04	24/09/2013	D	Sur	Contenido intestinal	19.110	77.6
5		L05	30/09/2013	A	Sur	Contenido intestinal	19.904	77.6
6		L06	04/10/2013	A	Sur	Contenido intestinal	19.079	77.6
7		L07	11/10/2013	C	Noroeste	Contenido intestinal	20.129	77.6
8		L08	28/10/2013	B	Sur	Contenido intestinal	18.991	77.6
9	2014	L09	05/12/2013	B	Sur	Contenido intestinal	17.368	77.6
10		L10	25/02/2014	E	Sureste	Contenido intestinal	23.627	77.6
11		L11	22/09/2014	F	Norte	Contenido intestinal	21.725	77.6

*Id: identificación de la muestra

4.4. Amplificación de dominio S1

Las 11 muestras fueron sometidas a la técnica de RT-PCR en dos pasos para la amplificación del dominio S1 del gen S en los cuatro segmentos previamente descritos. Al evaluar los productos tras el proceso de electroforesis se obtuvieron bandas intensas de los tamaños esperados de 670, 678, 565 y 745 pares de bases (pb) (Fig. 9) en siete (07) de las cepas seleccionadas. Por lo tanto, se purificaron y extrajeron un total de 28 segmentos a partir de los geles de agarosa para el posterior envío y secuenciamiento bidireccional. La información de las cepas secuenciadas se detalla en el Cuadro 4. Las cuatro cepas restantes presentaron amplificación incompleta, debido a ello no fueron incluidas en el presente estudio.

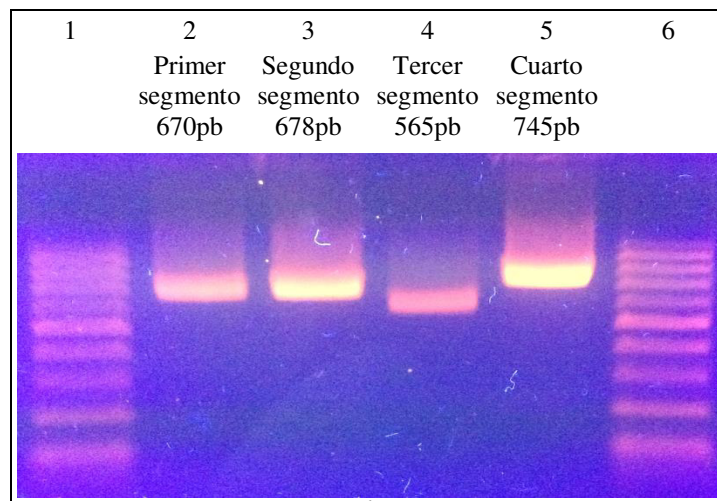


Figura 9. Electroforesis de los productos de la prueba de RT-PCR para la amplificación del dominio S1 de PEDV. Se observan los cuatro segmentos correspondientes al dominio S1 de una muestra. Los tamaños de banda son de 670, 678, 565 y 745pb respectivamente (carriles 2, 3, 4 y 5 respectivamente). Gel de agarosa 1.5%. Marcador de peso molecular 100pb (Promega) (carriles 1 y 6).

Cuadro 4. Información de las siete (07) cepas utilizadas para el secuenciamiento nucleotídico del dominio S1 del gen S de PEDV.

Nº	Año	Id.	Fecha de colección	Id. Granja	Región en Lima	Denominación de secuencia
1	2013	L01	22/07/2013	A	Sur	PERU/Lima01/2013
2		L04	24/09/2013	D	Sur	PERU/Lima04/2013
3		L05	30/09/2013	A	Sur	PERU/Lima05/2013
4		L07	11/10/2013	C	Noroeste	PERU/Lima07/2013
5		L08	28/10/2013	B	Sur	PERU/Lima08/2013
6		L09	05/12/2013	B	Sur	PERU/Lima09/2013
7	2014	L11	22/09/2014	F	Norte	PERU/Lima11/2014

*Id: identificación de la muestra

4.5. Alineamiento múltiple y análisis filogenético

Las secuencias completas y definidas fueron posteriormente alineadas entre ellas, definiéndose una longitud de 2303 nucleótidos en común para el análisis del dominio S1. Dicha secuencias abarcan desde el nucleótido 19 hasta el nucleótido 2327 correspondiente a la longitud del dominio S1 de PEDV, la cual presenta 2370 bases de las cepas de referencia disponibles en GeneBank. Las siete cepas peruanas secuenciadas y analizadas fueron denominadas según Cuadro N°4.

Se construyó un árbol filogenético basado en el alineamiento de secuencias múltiples de 84 secuencias de PEDV, siete (07) secuencias generadas en el presente estudio y 77 secuencias de cepas disponibles en GeneBank (Fig. 10) (Anexo 3), las cuales fueron seleccionadas como cepas históricas referenciales (cepas asiáticas) y cepas norteamericanas emergentes detectadas durante el año 2013 y 2014.

Basado en el análisis filogenético en el dominio S1, se pudo determinar la presencia de los dos genogrupos de PEDV en nuestro medio, el genogrupo 1 o S-INDEL (cepas que presentan inserciones y deleciones nucleotídicas características en el gen S) con una cepa peruana; y el genogrupo 2 con seis cepas peruanas. Específicamente la cepa del genogrupo 1 corresponde al subgrupo G1b (n=1); mientras que las cepas del genogrupo 2 corresponden al subgrupo G2a (n=6).

Las 06 cepas peruanas G2a (Lima01, Lima04, Lima05, Lima08 y Lima09), fueron obtenidas de brotes de PEDV durante el año 2013, y la cepa peruana G1b (Lima11), durante el año 2014.

El análisis filogenético ha determinado que las cepas peruanas G2a están ubicadas dentro del clado de clasificación de las cepas norteamericanas G2a; de igual manera, la cepa peruana G1b se encuentra ubicada en el clado de cepas norteamericanas G1b.

El análisis de distancia evidencia que las 6 cepas peruanas G2a presentaron valores de identidad de 99.7–100.0% entre ellas y de 99.3-100.0% con cepas norteamericanas descritas desde el año 2013-2014. Así mismo, la cepa G1b

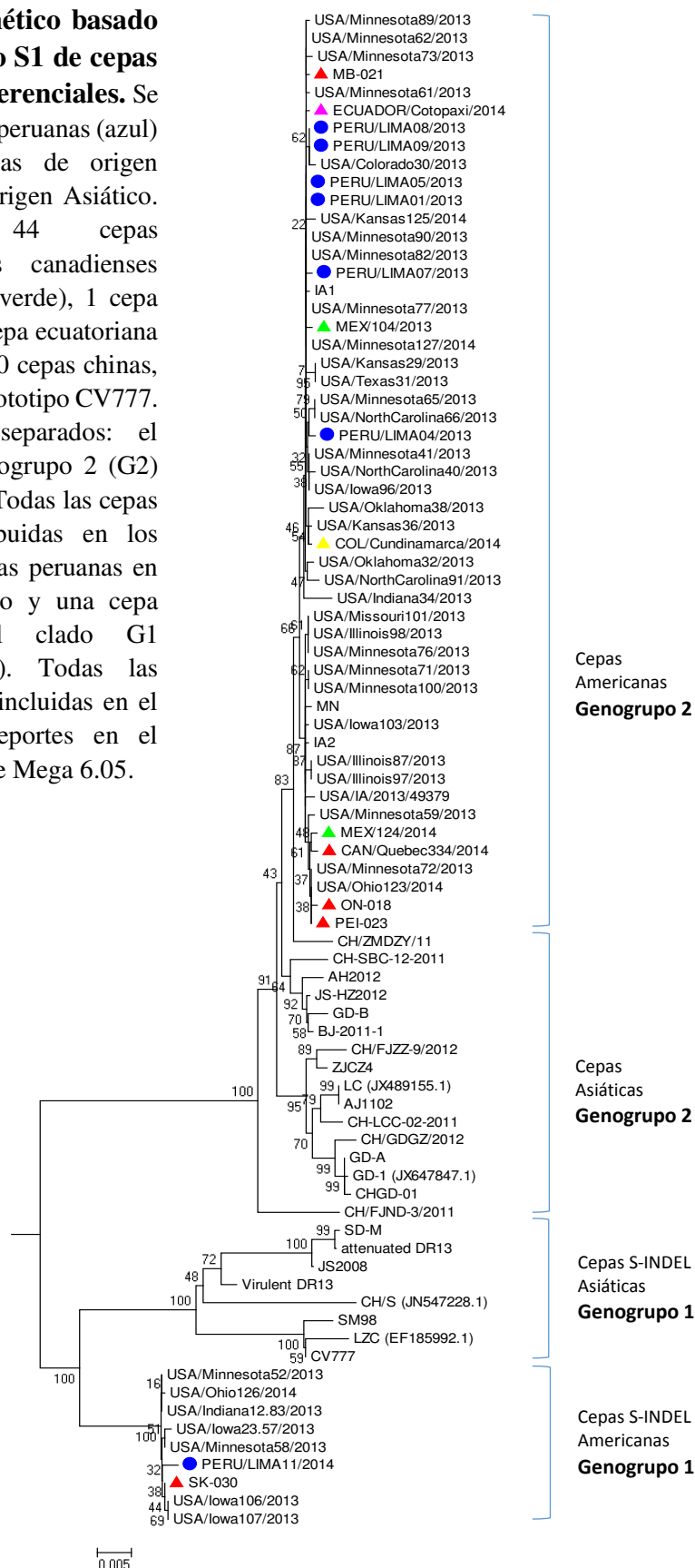
detectada en Perú, presenta valores de identidad de 99.6-99.7% con cepas G1b norteamericanas, mientras que se observa una relación más distante con respecto a las cepas asiáticas donde las cepas G2a peruanas (n=6) presentan valores de identidad de 98.5-99.2% con respecto a las cepas asiáticas; así mismo, la cepa S-INDEL peruana presenta 94.7-96.7% de identidad con respecto a las cepas S-INDEL asiáticas (Anexo 4).

La cepa Lima11, correspondiente al genogrupo G1b, con respecto a las cepas G2a, presenta una delección de un nucleótido en la posición 167, una delección de 11 nucleótidos en la posición 176-186, y una delección de 3 nucleótidos en la posición 417-419; así mismo presenta una inserción de 6 nucleótidos en la posición 474-475, característico de las cepas G1 también conocidas como S-INDEL. Con respecto a la cepa USA/Iowa106/2013 (la más cercana de las cepas estadounidenses), la cepa Lima11 presenta 9 mutaciones puntuales a lo largo del dominio S1 (Anexo 5).

Entre las cepas G2a peruanas (n=6), se pudo observar que las cepas Lima01 y Lima05 presentaron un valor de identidad del 100%, al igual que las cepas Lima08 y Lima09, permitiendo inferir que corresponden a la misma cepa respectivamente (Anexo 4).

Las cepas Lima01 y Lima05 comparten un valor de identidad del 100% con respecto a la cepa USA/Minnesota82/2013, pudiendo sugerir ser su probable origen. Con respecto a las demás cepas peruanas, presentan diferencias (mutaciones puntuales) en el nucleótido 1231 (T-C), 1807 (C-A) y 1908 (T-C) en relación a Lima04; en el nucleótido 1886 (C-T) y 2155 (A-G) en relación a Lima07; y nucleótido 1456 (C-T) en relación a Lima08 y Lima09 (Anexo 5).

Figura 10. Árbol filogenético basado en el análisis del dominio S1 de cepas de PEDV peruanas y referenciales. Se analizaron 84 cepas: 7 cepas peruanas (azul) en conjunto con 53 cepas de origen Americano y 23 cepas de origen Asiático. Cepas Americanas: 44 cepas estadounidenses, 5 cepas canadienses (rojo), 2 cepas mexicanas (verde), 1 cepa colombiana (amarillo) y 1 cepa ecuatoriana (rosado); Cepas Asiáticas: 20 cepas chinas, 3 cepas coreanas y la cepa prototipo CV777. Se observan 2 clados separados: el genogrupo 1 (G1) y el genogrupo 2 (G2) conocidas como S-INDEL. Todas las cepas peruanas se ubican distribuidas en los clados americanos; seis cepas peruanas en el clado G2 norteamericano y una cepa peruana ubicada en el clado G1 norteamericano (S-INDEL). Todas las cepas de origen americano incluidas en el análisis corresponden a reportes en el periodo 2013-2014. Software Mega 6.05.



V. Discusión

Las 30 muestras de contenido intestinal e hisopados rectales fueron preseleccionadas del banco de muestras del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección Virología, como parte del servicio de diagnóstico de enfermedades virales que ofrece al sector pecuario, entre ellas PED. El criterio para la preselección fue tener la historia clínica completa como: signos clínicos compatibles con PED, procedencia, fecha de envío, tipo de muestra, resultados de inmunocromatografía positiva y lecturas de RT-PCR en tiempo real positivas a PEDV; siendo el determinante de preselección los Ct menores a 22.

Al ser las muestras recolectadas desde el año 2013 hasta el 2015, cuando se inicia el brote de PEDV en el país, se reevaluaron las 30 muestras preseleccionadas en un RT-PCR en tiempo real para seleccionar aquellas que hayan mantenido una alta carga viral a lo largo del periodo de almacenamiento, característica requerida para asegurar un buen desarrollo de la metodología de secuenciamiento. Por esta razón, se seleccionaron 11 muestras de contenido intestinal con bajos valores de Ct (menor a 24) asegurando tener mayor carga viral (Cuadro 3). La obtención de las muestras de contenido intestinal, evidenció ser, la muestra idónea, al tener mayor carga viral, en comparación a los hisopados rectales, ya que este tipo de muestra corresponde a una metodología que busca la detección del agente al margen de la carga viral. Además, es probable que las 19 muestras no seleccionadas para el estudio, hayan sido afectadas por tiempo y temperatura (Hofmann y Wyler, 1989), ya que a 38°C por 12 horas, 20°C por 24 horas y 54°C por 10 minutos hay una reducción de la infectividad viral de 50, 75 y 90%, respectivamente (Thomas *et al.*, 2014). Así como, el proceso de descongelamiento y congelamiento de las muestras podrían inducir a la inactivación del agente viral, degradando el ARN genómico por efecto de nucleasas presentes en las heces, sabiendo que, hay mayor cantidad de inhibidores de PCR en las heces en comparación a las muestras de contenido intestinal (Das *et al.*, 2006).

La prueba de inmunocromatografía es una técnica cualitativa, rápida y sensible que permite detectar en 10 minutos la presencia del virus de PED/TGE en muestras de heces. Presenta una sensibilidad y especificidad del 92 y 98%, respectivamente (Song y Park, 2012) y en nuestro estudio se utilizó, en un primer momento, para diferenciar si los signos clínicos eran debido a PEDV o a TGEV; ya que, tanto los signos clínicos como las lesiones macroscópicas y microscópicas asociadas a infecciones por PEDV son similares a las descritas en el caso de TGEV (Madson *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2014); y el Perú ya había reportado un brote de TGEV en el 2012 (Ramírez *et al.*, 2014). Sin embargo, todas las muestras hasta la fecha, resultaron positivas a PEDV por Inmunocromatografía (Fig. 6).

Hasta la fecha varias técnicas moleculares han sido desarrolladas con el objetivo de diagnosticar rápidamente al virus de la diarrea epidémica porcina, diferenciándolo de otros coronavirus entéricos como TGEV y PDCoV (Deltacoronavirus), siendo los más utilizados los RT-PCR en tiempo real con sondas Taqman (Song y Park, 2012). Por consiguiente, la Sección de Virología, ante los brotes de diarreas en lechones, estandarizó y validó una prueba en tiempo real que permite diferenciar TGEV y PEDV, amplificando un segmento conservado del gen ORF3 del virus de PEDV y del gen S de TGEV. Asimismo, con apoyo del SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria) se pudo validar la técnica al facilitar la importación de ADNc del virus de PEDV desde APHIS, USA (SENASA, 2013; More *et al.*, 2014).

Los lechones evaluados *in vivo* en este estudio, mostraron todos los signos clínicos de una infección por PEDV, así como las lesiones anatómicas e histopatológicas de los intestinos delgados que correlacionan altamente con los daños que produce el virus en los enterocitos (Puranajeva *et al.*, 2009; Jung y Saif, 2015). Tras el brote del año 2013, en el Perú diversos casos fueron reportados presentando cuadros clínicos severos como los descritos en China (2010 en adelante) (Huang *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2015) y Estados Unidos (2013) (Oka *et al.*, 2014; Lee, 2015) presentando alta morbilidad y mortalidad (de casi 100% en ambas tasas). Las referencias de morbilidad en los brotes del Perú son inexactas, sin embargo los porcicultores reportan rangos de morbilidad y mortalidad del 70 al 100% (Rivera 2013, datos no publicados).

Durante el procesamiento de las 11 muestras para el secuenciamiento, mediante el protocolo de amplificación del dominio S1 (en cuatro segmentos), se obtuvieron productos completos de 7 de las 11 muestras analizadas. Las 7 muestras evidenciaron la amplificación de los 4 de forma intensa (Fig. 9), a diferencia de las cuatro cepas restantes, donde se observó intensidad leve de algunas bandas, e inclusive ausencia de producto. La ausencia de productos puede deberse a la capacidad variante de las cepas. Los cebadores específicos utilizados presentan nucleótidos degenerados (Cuadro 2) que permiten ampliar el rango de detección a lo largo del dominio S1, ya que en esta secuencia se encuentra las zonas de mayor variabilidad genética del virus. Por otro lado, la ausencia pudo ser causada por daño del ARN genómico durante todo el proceso de extracción (Beerenwinkel *et al.*, 2012; Marston *et al.*, 2013).

Al realizar el análisis filogenético, basado en el análisis del dominio S1 de cepas peruanas del PEDV en relación a diversas cepas globales y referenciadas en GeneBank (Anexo 3), se pudo observar la estrecha relación entre las cepas peruanas y las cepas Norteamericanas (valores de identidad del 99.3-100%) (Anexo 4), confirmando la hipótesis del origen estadounidense de las cepas peruanas, en vista a la ruta de diseminación observada tras la emergencia en los Estados Unidos, que afectó a Canadá y México poco tiempo después, y posteriormente a Sudamérica, donde el virus ingresó a Perú a los pocos meses después (SENASA, 2013). El ingreso del virus al Perú se atribuye a la estrecha relación comercial de porcinos vivos existente con los Estados Unidos, debido a que los principales centros porcinos nacionales importan animales reproductores provenientes de planteles estadounidenses con el fin de introducir nueva genética porcina para la mejora de la productividad en las granjas tecnificadas, de esta manera, pudo ingresar al Perú un animal adulto portador clínicamente sano que diseminara el virus en granjas libres y desencadenara la enfermedad en la población susceptible (Sasaki *et al.*, 2016). Por otro lado, la rápida transmisión de la enfermedad entre granjas en el Perú se asocia al comercio de animales entre granjas locales, así como a través de fómites, ya sea por personas, por comercio y/o préstamo equipos, materiales e incluso por contaminación cruzada de

alimentos e insumos, tal como describen diversos investigadores (Lowe et al., 2014; Jung y Saif, 2015; Lv et al., 2016; Sasaki *et al.*, 2016).

Las fuentes alimenticias derivadas de animales, así como el plasma utilizado como aditivo en el alimento, se pensó inicialmente que fungían como fuente de alto riesgo de transmisión. Sin embargo, diversos estudios han evidenciado que el plasma no es una fuente significativa de transmisión del virus tras la aplicación de adecuadas metodologías de procesamiento (Foddai *et al.*, 2015; Sampedro *et al.*, 2015); de igual manera, los tratamientos térmicos y no térmicos requeridos para el procesamiento de diversos insumos alimenticios animales, al aplicarse siguiendo los protocolos estrictamente (Sampedro *et al.*, 2015; Trudeau *et al.*, 2016); así mismo, las medidas de almacenamiento comercial establecidas en Estados Unidos y Europa (periodo de almacenamiento extendido previo a la comercialización de los productos), proveen garantía adicional de la inactivación de virus residual (Sampedro *et al.*, 2015).

La filogenética, la cual es ampliamente aplicada en la comparación y análisis de las secuencias nucleotídicas, es una herramienta muy importante en el estudio de genes de virus de rápida evolución. Ha sido ampliamente utilizada para describir la epidemiología molecular y transmisión local y global de diversos virus de importancia en salud pública y animal (Hungnes *et al.*, 2000; Lam *et al.*, 2010). Por lo que el análisis filogenético de las cepas del PEDV peruanas es importante para determinar la procedencia del virus, así como conocer la diversidad genética de las cepas circulantes y entender mejor la evolución natural del virus emergente, permitiendo determinar el curso de la distribución y los cambios moleculares propios del agente en adaptación a las condiciones de crianza existentes en el país. Además, este tipo de estudios favorecen las investigaciones en temas de salud para diseñar vacunas más eficaces, superar la resistencia a fármacos, o evidenciar cómo un virus se está extendiendo en una población y, por consiguiente, cómo puede ser contenido y controlado para la protección de la salud (Lam *et al.*, 2010). La información obtenida permitirá dar bases para la implementación de oportunos programas de control y erradicación de PED por parte de la autoridad sanitaria nacional (SENASA) y proveer importantes datos para el desarrollo de vacunas

efectivas contra cepas emergentes nacionales como estrategia preventiva (Lam *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2013).

Observados los resultados del presente estudio, se pudo determinar la presencia de los dos genotipos de PEDV en el Perú. Las cepas Lima01, Lima04, Lima05, Lima08 y Lima09, correspondientes a 6 de las 7 cepas analizadas detectadas durante el año 2013, corresponden al genogrupo 2 (G2) subgrupo G2a, dentro del clado de clasificación de las cepas norteamericanas. La cepa Lima11, detectada en el año 2014, corresponde al genogrupo 1 (G1) subgrupo G1b, conocidas también como S-INDEL por presentar inserciones y deleciones características en el dominio S1 del gen S con respecto al genogrupo 2, acorde a la descripción de diversos autores (Lee, 2015; Lv *et al.*, 2016).

Si bien, el presente trabajo no permite determinar el momento de ingreso de las diferentes cepas al país, permite especular sobre la presencia simultánea de cepas correspondientes a los dos genogrupos a partir del brote en el año 2013. Así mismo, los resultados reflejan la variación existente en las cepas de nuestro medio (99.7–100.0%) (Anexo 5). Se pudieron observar mutaciones puntuales a lo largo de la secuencia S1 analizada en las diferentes cepas peruanas (Anexo 5).

Las cepas Lima01 y Lima05 presentan 100% de identidad entre ellas, lo que permite inferir en que se trate de la misma cepa viral. Estas cepas fueron detectadas en la misma granja (Granja A) en dos momentos diferentes y en diferentes planteles de la granja. Ello evidenciaría la capacidad de diseminación del virus dentro de la granja rápidamente. De igual manera, las cepas Lima08 y Lima09, comparten una identidad del 100% de la secuencia analizada, proviniendo ambas de una misma granja (Granja B) en dos momentos diferentes y de planteles diferentes (Cuadro 2). Los coronavirus poseen el genoma de ARN más largo conocido. Sin embargo, ellos mantienen un proceso de replicación estable y de alta fidelidad en sus genomas mientras que paralelamente generan cierta diversidad genética requerida para la adaptación y emergencia. Esta característica puede adjudicarse a la actividad de corrección exorribonucleasa por parte de nsp14 viral (Sawicki, 2009; Smith y Denison, 2013). De esta manera, se asume que PEDV experimenta un proceso evolutivo lento, acumulando

mutaciones y recombinaciones que permitan su óptima adaptación (Kim *et al.*, 2015; Lee, 2015).

En el presente estudio se determinó la presencia del genogrupa G1b (S-INDEL) similar a los del grupo norteamericano. Si bien, como indican Vlasova *et al.* (2014), así como en otros diversos trabajos, las cepas descritas como S-INDEL, han evidenciado cambios en la presentación clínica, a diferencia de las cepas clásicas (no S-INDEL) donde se observan los severos y extremos cuadros de diarrea en lechones que incluso afectan, con menor virulencia, a las madres y a otros lechones de edades mayores a 3 semanas. Las cepas S-INDEL han sido descritas globalmente como cepas de menor virulencia, reportadas en cuadros clínicos de menor severidad, y esto se asocia a las diversas inserciones y deleciones presentes en el gen S (Marthaler *et al.*, 2014; Vlasova *et al.*, 2014). De la misma forma, en nuestro estudio la presentación clínica de la cepa Lima11 fue la misma que las descritas para la cepa S-INDEL norteamericana, con cuadros menos severos donde la morbilidad y mortalidad fueron menores en relación a las descritas en el brote inicial del 2013.

Durante la emergencia y diseminación del Virus de la Diarrea Epidémica Porcina (PEDV) en los Estados Unidos en el año 2013, prosiguió con el ingreso a otros países norteamericanos, como son Canadá y México, y diversos países latinoamericanos (Oka *et al.*, 2014; Jarvis *et al.*, 2016). PEDV ha sido reportado en Perú durante el año 2013 (SENASA, 2013), y en República Dominicana, Colombia y Ecuador durante el año 2014 (Huang *et al.*, 2013; Oka *et al.*, 2014; Lee, 2015; Jarvis *et al.*, 2016). En el Perú, posterior a su ingreso se pudo observar una rápida diseminación de PEDV en diversas granjas debido tanto al alto riesgo reflejado en el comercio de animales de granja a granja, así como por el ingreso de vehículos, personas y otros diversos fómites provenientes de granjas infectadas a granjas susceptibles. En vista de no contar con mayores sistemas de monitoreo y control de un agente hasta ese momento considerado exótico para nuestro país, la diseminación conllevó a cuantiosas pérdidas económicas en un corto periodo de tiempo, ocasionado por las altas tasas de mortalidad de lechones lactantes en diversas granjas porcinas de Lima, de igual manera descritas en Norteamérica por diversos autores (Oka *et al.*, 2014; Lee, 2015; Jarvis *et al.*, 2016), donde las

pérdidas ocasionadas por PEDV fueron calculadas entre los 900 millones a 1.8 billones de dólares americanos anuales durante los años 2013 y 2014 (Langel *et al.*, 2016).

Ante la evidencia de la presencia de ambos tipos de cepas PEDV en el Perú, y habiéndose superado la severa epidemia, obteniéndose por el desarrollo de inmunidad contra las cepas locales, se debe tener en cuenta la probabilidad de que el agente pueda permanecer circulante en las granjas (Saif *et al.*, 2012). De esta manera existe el riesgo de que con el paso del tiempo se desarrolle una infección en animales más susceptibles, reemergiendo la enfermedad. Por ello, es necesario adaptar programas de prevención y control dentro de las granjas con el objetivo de monitorear la presencia del virus mediante técnicas altamente sensibles y específicas, como la técnica de RT-PCR, para realizar el descarte de animales portadores que representen un riesgo para la reemergencia de la enfermedad (Saif *et al.*, 2012; Song y Park, 2012).

En los países asiáticos, el uso de vacunas basadas en la cepa de campo CV777 obtuvo buenos resultados en el desarrollo de inmunidad en las madres y de los lechones, sin embargo, al emerger una nueva variante en el año 2010, los animales previamente vacunados no presentaron protección, evidenciando que la nueva variante era una cepa PEDV que presentaba diferencias genéticas con respecto a las cepas vacunales asociadas a su capacidad de infección, y por tanto, la vacuna no confería protección (Lee, 2015). Se debe tener en cuenta que es ideal utilizar protocolos de inmunización basados en antígenos obtenidos de cepas locales que desarrollen inmunidad contra las cepas propias de cada región, con óptimas metodologías de prevención de la enfermedad (Oh *et al.*, 2014; Lee, 2015). Por esta razón, deben realizarse mayores estudios, con respecto a las cepas peruanas, en miras de poder obtener en el futuro una vacuna desarrollada a partir de cepas locales, para lo cual deben obtenerse altas concentraciones virales mediante cultivo celular. En nuestro laboratorio se realizó la inoculación en células VERO, utilizando tripsina para permitir el ingreso del virus a las células (Pan *et al.*, 2012; Jung y Saif, 2015) a fin de lograr el aislamiento viral. El protocolo utilizado fue una adaptación de los protocolos descritos por Pan *et al.* (2012) y Oka *et al.* (2014), sin embargo hasta el momento no ha podido lograrse

una tasa de replicación alta que permita obtener altas cantidades de viriones. Cabe mencionar que diversos autores coinciden en la dificultad que representa adaptar esta técnica en el laboratorio (Chen *et al.*, 2014; Oka *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Sin embargo, se continúa realizando las adaptaciones correspondientes a fin de obtener un protocolo más eficiente para el aislamiento del PEDV en el Laboratorio.

Cabe mencionar que en las granjas diagnosticadas con el PEDV, realizan diversos procedimientos para el control de esta enfermedad, siendo el principal la metodología del “Feedback”, donde las madres son expuestas a agentes patógenos y no patógenos presentes en los intestinos y otras vísceras de lechones afectados con cuadros de diarrea, para de esta manera, desarrollar inmunidad en las marranas que puedan transferírsela a su progenie mediante inmunización pasiva a través del calostro (Langel *et al.*, 2016). Este procedimiento ha de haber favorecido al aumento de la inmunidad específica contra el agente, lo cual se vio reflejado en la disminución progresiva de la presentación clínica de la enfermedad en los lechones lactantes. Sin embargo, su empleo podría ser contraproducente, al no conocerse la cantidad de partículas virales que son dosificadas en las marranas, ni la presencia de otros agentes virales que podrían estar siendo incluidos en el “Feedback” (Goede y Morrison, 2016). Por esta razón, se sugiere realizar más estudios acerca de la producción de vacunas autógenas por cada región.

Actualmente en el Perú existe una fuerte presión por parte de los productores en la importación de vacunas a fin de proteger a sus animales de la infección, sin embargo, teniendo en cuenta que PED no es considerada una enfermedad de notificación obligatoria para la OIE (OIE, 2014), la autoridad sanitaria oficial, SENASA, aún no ha habilitado oficialmente procedimientos ni normas para su control y prevención, ni mucho menos para la importación y uso de vacunas comerciales internacionales al carecer de información sobre las características genéticas de las cepas que circulan en granjas porcinas del país, y menos aún, sobre la relación genética con otras cepas globales ya publicadas. Así mismo, al ser PED una enfermedad emergente para nuestro país, toma un lugar importante el establecer técnicas más idóneas dentro del diagnóstico diferencial, al existir en nuestro territorio diversos agentes causantes de cuadros diarreicos en

lechones, así como en la elaboración de diversos ensayos que permitan implementar el uso de vacunas autógenas que conlleven al control y prevención de esta enfermedad (Oka *et al.*, 2014; Lee, 2015).

El análisis filogenético de las cepas del PEDV identificadas en el Perú, ha permitido determinar el origen y las posibles rutas de ingreso al país, así como determinar la variabilidad de las mismas en nuestro territorio. Este sería el primer estudio del origen de las cepas del PEDV que circulan en granjas porcinas del Perú. Con la información obtenida en este trabajo, se espera contribuir en el diseño de programas adecuados de prevención, control y erradicación de la enfermedad, acorde a las condiciones de nuestro país.

VI. Conclusiones

- Las cepas peruanas del virus de la diarrea epidémica porcina detectadas en el 2013-2014 son de origen norteamericano.
- Las cepas peruanas pertenecen a los 2 genogrupos de PEDV, el genogrupo 1 (G1) o S-INDEL: cepa Lima11; y genogrupo 2 (G2): cepas Lima01, Lima04, Lima05, Lima07, Lima08 y Lima09
- Las cepas detectadas en Lima, Perú, presentan variaciones puntuales que las hacen diferentes entre ellas, lo que evidencia variantes identificadas propias de nuestro territorio.

VII. Referencias Bibliográficas

1. Alonso C, Goede DP, Morrison RB, Davies PR, Rovira A, Marthaler DG, Torremorell M. 2014. Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Vet Res.* 45:73. doi: 10.1186/s13567-014-0073-z
2. Annamalai T, Saif LJ, Lu Z, Jung K. 2015. Age-dependent variation in innate immune responses to porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling versus weaned pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 168(3–4):193–202. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.09.006
3. [ASOPORCI] Asociación Peruana de Porcicultores. 2016. Lima, Perú. [Internet], [30 junio 2016]. Disponible en: <http://www.elperuano.pe/noticia-crianza-porcina-aumenta-lima-42013.aspx>
4. Beerenwinkel N, Günthard HF, Roth V, Metzner KJ. 2012. Challenges and opportunities in estimating viral genetic diversity from next-generation sequencing data. *Front Microbiol.* 3: 329. doi: 10.3389/fmicb.2012.00329
5. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Roitter PJ. 2003. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J. Virol.* 77, 8801–8811.
6. Bowman AS, Krogwold RA, Price T, Davis M, Moeller SJ. 2015. Investigating the introduction of porcine epidemic diarrhea virus into an Ohio swine operation. *Vet Res.* 11:38. doi: 10.1186/s12917-015-0348-2.
7. Chang SH, Bae JL, Kang TJ, Kim J, Chung GH, Lim CW, Laude H, Yang MS, Jang YS. 2002. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Mol. Cells* 14, 295–299.
8. Cao L, Ge X, Gao Y, Ren Y, Ren X, Li G. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection induces NF- κ B activation through the TLR2, TLR3, and TLR9 pathways in porcine intestinal epithelial cells. *J Gen Virol.* 96(Pt 7):1757-1767. doi: 10.1099/vir.0.000133
9. Cao L, Ge X, Gao, Herrler G, Ren Y, Ren X, Li G. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus inhibits dsRNA-induced interferon-beta production in porcine intestinal epithelial cells by blockade of the RIG-I-mediated pathway. *Virol J.* 12:127. doi: 10.1186/s12985-015-0345-x.
10. Cavanagh D. 2005. Coronavirus: a review of coronaviruses and toroviruses. In: Schmidt A, Wolff MH, Weber O. eds *Coronaviruses with Special Emphasis on First Insights Concerning SARS*. Birkhäuser Basel-Switzerland. 1-54p. doi: 10.1007/3-7643-7339-3_1
11. Chae C, Kim O, Choi C, Min K, Cho WS, Kim J. Tai JH. 2000. Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs. *Vet Rec.* 147:606-8.
12. Chang SH, Bae JL, Kang TJ, Kim J, Chung GH, Lim CW, Laude H, Yang MS, Jang YS. 2002. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Mol Cells* 14(2):295–299.

13. Chen J, Liu X, Shi D, Shi H, Zhang X, Li C, Chi Y, Feng L. 2013. Detection and Molecular Diversity of Spike Gene of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in China. *Viruses* 5, 2601-2613. doi:10.3390/v5102601
14. Chen Q, Li G, Stasko J, Thomas JT, Stensland WR, Pillatzki AE, Gauger PC, Schwartz KJ, Madson D, Yoon KJ, Stevenson GW, Burrough ER, Harmon KM, Main RG, Zhang J. 2014. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *J Clin Microbiol.* 52(1):234-243. doi: 10.1128/JCM.02820-13
15. Cima G. 2014. PED virus reinfecting U.S. herds. Virus estimated to have killed 7 million-plus pigs. *J Am Vet Med Assoc* 245:166-167.
16. Chen X, Zeng L, Yang J, Yu F, Ge J, Guo Q, Gao X, Song T. 2013. Sequence Heterogeneity of the ORF3 Gene of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses Field Samples in Fujian, China, 2010–2012. *Viruses* 5, 2375-2383. doi:10.3390/v5102375
17. Clewley JP, Arnold C. 1997. MEGALIGN. The multiple alignment module of LASERGENE. *Methods Mol Biol.* 70:119-29.
18. Das A, Spackman E, Senne D, Pedersen J, Suarez DL. 2006. Development of an Internal Positive Control for Rapid Diagnosis of Avian Influenza Virus Infections by Real-Time Reverse Transcription-PCR with Lyophilized Reagents. *J. Clin. Microbiol.* 44(9), 3065-3. doi: 10.1128/JCM.00639-06
19. Debouck P, Pensaert M. 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777. *Am. J. Vet. Res.* 41, 219–223.
20. Dee S, Clement T, Schelkopf A, Nerem J, Knudsen D, Christopher-Hennings J, Nelson E. 2014. An evaluation of contaminated complete feed as a vehicle for porcine epidemic diarrhea virus infection of naïve pigs following consumption via natural feeding behavior: proof of concept. *BMC Veterinary Research* 10:176. doi: 10.1186/s12917-014-0176-9.
21. Ding Z, Fang L, Jing H, Zeng S, Wang D, Liu L, Zhang H, Luo R, Chen H, Xiao S. 2014. Porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein antagonizes beta interferon production by sequestering the interaction between IRF3 and TBK1. *J Virol.* 88(16):8936–8945. doi: 10.1128/JVI.00700-14.
22. Duy DT, Toan NT, Puranaveja S, Thanawongnuwech R. 2011. Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates from southern Vietnam during 2009–2010 outbreaks. *Thai J Vet Med.* 41 (1): 55–64.
23. [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. Animal Production and Health. Pigs. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/pigs>
24. Foddai A, Nielsen LH, Møgelmoose V, Alban L. 2015. Probability of introducing porcine epidemic diarrhea virus into Danish pig herds by imported spray-dried porcine plasma. *Porcine Health Management* 1:18-28. doi: 10.1186/s40813-015-0010-1.
25. Gao Q, Zhao S, Qin T, Yin Y, Yang Q. 2015. Effects of porcine epidemic diarrhea virus on porcine monocyte-derived dendritic cells and intestinal dendritic cells. *Vet Microbiol.* 179(3–4):131–141. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.05.016.

26. Gerber PF, Gong Q, Huang YW, Wang C, Holtkamp D, Opriessnig T. 2014. Detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in serum and colostrum by indirect ELISA. *Vet J.* 202:33–36. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.07.018.
27. Gerber PF, Opriessnig T. 2015. Detection of immunoglobulin (Ig) A antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in fecal and serum samples. *MethodsX.* 2:368–373. doi: 10.1016/j.mex.2015.10.00.
28. Goede D, Morrison RB. 2016. Production impact y time to stability in sow herds infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). *Prev Vet Med* 123, 202–207. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.11.010
29. Gu J, Gong E, Zhang B, Zheng J, Gao Z, Zhong Y, Zou W, Zhan J, Wang S, Xie Z, Zhuang H, Wu B, Zhong H, Shao H, Fang W, Gao D, Pei F, Li X, He Z, Xu D, Shi X, Anderson VM, Leong AS. 2005. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J Exp Med* 202(3): 415–424. doi: 10.1084/jem.20050828
30. Hofmann M, Wyler R. 1988. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J Clin Microbiol* 26:2235–2239.
31. Hofmann M, Wyler R. 1989. Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV). *Vet Microbiol* 20:131–142.
32. Hofmann M, Wyler R. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhea coronavirus antibodies in swine sera. *Vet Microbiol.* 21(3):263–73.
33. Hu H, Jung K, Vlasova AN, Chepngeno J, Lu Z, Wang Q, Saif LJ. 2015. Isolation and Characterization of Porcine Deltacoronavirus from Pigs with Diarrhea in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 53(5):1537–1548. doi:10.1128/JCM.00031-15
34. Huang YW, Dickerman AW, Piñeyro P, Li L, Fang L, Kiehne R, Opriessnig T, Men XJ. 2013. Origin, Evolution, and Genotyping of Emergent Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains in the United States. *mBio* 4(5):00737–13. doi:10.1128/mBio.00737-13.
35. Hungnes O, Jonassen Tø, Jonassen CM, Grinde B. 2000. Molecular epidemiology of viral infections. *APMIS*, 108: 81–97. doi:10.1034/j.1600-0463.2000.d01-31.x
36. [INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. Ministerio de Agricultura y Riego. 2013. IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Resultados Definitivos. Lima, Perú. 62p.
37. Jarvis MC, Lam HC, Zhang Y, Wang L, Hesse RA, Hause BM, Vlasova A, Wang Q, Zhang J, Nelson MI, Murtaugh MP, Marthaler D. 2016. Genomic and evolutionary inferences between American and global strains of porcine epidemic diarrhea virus. *Preventive Veterinary Medicine* 123, 175–184. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.10.020
38. Jung K, Eyerly B, Annamalai T, Lu Z, Saif LJ. 2015. Structural alteration of tight and adherens junctions in villous and crypt epithelium of the small and large intestine of conventional nursing piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Veterinary Microbiology.* 177 (3–4):373–378. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.03.022
39. Jung K, Saif LJ. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *The Veterinary Journal* 204 (2): 134–143. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.02.017

40. Jung K, Wang Q, Scheuer KA, Lu Z, Zhang Y, Saif LJ. 2014. Pathology of US Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain PC21A in Gnotobiotic Pigs. *Emerg Infect Dis* 20, 662-665. doi: 10.3201/eid2004.131685
41. Kamau NA, Park JY, Park JE, Hyun BH, Yang DK, Song JY, Shin HJ. 2010. Susceptibility of Mice to Porcine Epidemic Diarrhea Virus. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9(24): 3114-3116. doi: 10.3923/javaa.2010.3114.3116
42. Kim SH, Lee JM, Jung J, Kim IJ, Hyun BH, Kim HI, Park CK, Oem JK, Kim YH, Lee MH, Lee KK. 2015. Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus in Korea from 1998 to 2013. *Arch Virol.* 160(4):1055–1064. doi: 10.1007/s00705-015-2353-y
43. Kim O, Chae C. 2000. In situ hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues from naturally infected piglets. *Vet. Pathol* 37, 62–67.
44. Kim O, Chae C. 2002. Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine epidemic diarrhea virus in pigs. *Can J Vet Res.* 66(2): 112–116.
45. Kim Y, Lee C. 2014. Porcine epidemic diarrhea virus induces caspase-independent apoptosis through activation of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Virology* 460–461, 180–193. doi: 10.1016/j.virol.2014.04.040
46. Kim SY, Song DS, Park BK. 2001. Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J Vet Diagn Invest.* 13:516–520.
47. Kimura M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 16:111-120. doi: 10.1007/bf01731581
48. Kweon CH, Kwon BJ, Jung TS, Kee YJ, Hur DH, Hwang EK, Rhee JC, An SH. 1993. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection in Korea. *Korean J Vet Res* 33:249-254.
49. Kweon CH, Kwon BJ, Lee JG, Kwon GO, Kang YB. 1999. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine.* 17:2546–2553.
50. Kwon HJ, Ryu YB, Kim YM, Song N, Kim CY, Rho MC, Jeong JH, Cho KO, Lee WS, Park SJ. 2013. In vitro antiviral activity of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* against porcine epidemic diarrhea coronavirus infection and hemagglutination. *Bioorganic y medicinal chemistry*, 21(15), 4706-4713. doi: 10.1016/j.bmc.2013.04.085
51. Lam TT, Hon CC, Tang JW. 2010. Use of phylogenetics in the molecular epidemiology and evolutionary studies of viral infections. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 47(1):5-49. doi: 10.3109/10408361003633318
52. Langel SN, Paim FC, Lager KM, Vlasova AN, Saif LJ. 2016. Lactogenic Immunity and Vaccines for Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV): Historical and Current Concepts. *Virus Research.* doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.016
53. Lee C. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology Journal* 12:193. doi: 10.1186/s12985-015-0421-2

54. Lee DK, Cha SY, Lee C. 2011. The N-terminal region of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein is important for the receptor binding. *Korean J Microbiol Biotechnol.*39:140–5.
55. Lee DK, Park CK, Kim SH, Lee C. 2010. Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Research* 149, 175–182. doi: 10.1016/j.virusres.2010.01.015
56. Lee S, Park GS, Shin JH, Lee C. 2014. Full-genome sequence analysis of a variant strain of porcine epidemic diarrhea virus in South Korea. *Genome Announc* 2(6):e01116-14. doi: 10.1128/genomeA.01116-14
57. Lee HM, Lee BJ, Tae JH, Kweon CH, Lee YS, Park JH. 2000. Detection of porcine epidemic diarrhea virus by immunohistochemistry with recombinant antibody produced in phages. *J Vet Med Sci* 62(3):333-7.
58. Lee S, Lee C. 2014. Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013. *Emerg Infect Dis.* 20:1223–6. doi: 10.3201/eid2007.140294
59. Li BX, Ge JW, Li JL. 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology* 365, 166–172. doi:10.1016/j.virol.2007.03.031
60. Li W, Li H, Liu Y, Pan Y, Deng F, Song Y, Tang X, He Q. 2012. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerg Infect Dis.* 8:1350–1353.
61. Lin CM, Annamalai T, Liu X, Gao X, Lu Z, El-Tholoth M, Hu H, Saif LJ, Wang Q. 2015. Experimental infection of a US spike-insertion deletion porcine epidemic diarrhea virus in conventional nursing piglets and cross-protection to the original US PEDV infection. *Vet Res* 46:134. doi: 10.1186/s13567-015-0278-9
62. Lin CN, Chung WB, Chang SW, Wen CC, Liu H, Chien CH, Chiou MT. 2014. US-like strain of porcine epidemic diarrhea virus outbreaks in Taiwan, 2013–2014. *J Vet Med Sci.* 76:1297-1299.
63. Lissenberg A, Vrolijk MM, van Vliet AL, Langereis MA, de Groot-Mijnes JD, Rottier PJ, de Groot RJ. 2005. Luxury at a cost? Recombinant mouse hepatitis viruses expressing the accessory hemagglutinin esterase protein display reduced fitness in vitro. *J Virol* 79(24):15054-63. doi: 10.1128/JVI.79.24.15054-15063.2005
64. Lowe J, Gauger P, Harmon K, Zhang J, Connor J, Yeske P, Loula T, Levis I, Dufresne L, Main R. 2014. Role of Transportation in Spread of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection, United States. *Emerging Infectious Diseases* 20(5), 872–874. doi: 10.3201/eid2005.131628
65. Lv C, Xiao Y, Li XD, Tian K. 2016. Porcine epidemic diarrhea virus: current insights. *Virus Adaptation and Treatment* 8, 1-17. doi: 10.2147/VAAT.S107275
66. Madson DM, Magstadt DR, Arruda PH, Hoang H, Sun D, Bower LP, Bhandari M, Burrough ER, Gauger PC, Pillatzki AE, Stevenson GW, Wilberts BL, Brodie J, Harmon KM, Wang C, Main RG, Zhang J, Yoon KJ. 2014. Pathogenesis of porcine epidemic diarrhea virus isolate (US/Iowa/18984/2013) in 3-week-old weaned pigs. *Vet Microbiol* 174(1-2):60-68. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.09.002

67. Marston DA, McElhinney LM, Ellis RJ, Horton DL, Wise EL, Leech SL, David D, de Lamballerie X, Fooks AR. 2013. Next generation sequencing of viral RNA genomes. *BMC Genomics* 14:444. doi: 10.1186/1471-2164-14-444
68. Marthaler D, Bruner L, Collins J, Rossow K. 2014. Third strain of porcine epidemic diarrhea virus, United States. *Emerg Infect Dis* 20(12):2162-163. doi: 10.3201/eid2014.140908.
69. More-Bayona J, Ramírez-Velásquez M, Manchego-Sayán A, Quevedo-Valle M, Rivera Gerónimo H. 2014. Molecular detection of emerging strains of PEDV in Peru. In: 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. Volume I. Virology and Viral diseases-Coronaviruses; 2014 June 8-11; Cancun, Mexico.
70. Nam E, Lee C. 2010. Contribution of the porcine aminopeptidase N (CD13) receptor density to porcine epidemic diarrhea virus infection. *Veterinary Microbiology* 144, 41–50. doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.024
71. Oh JS, Song DS, Park BK. 2003. Identification of a putative cellular receptor 150 kDa polypeptide for porcine epidemic diarrhea virus in porcine enterocytes. *J Vet Sci.* 4(3):269-75.
72. Oh JS, Song DS, Yang JS, Song JY, Moon HJ, Kim TY, Park BK. 2005 Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with serum neutralization test for serodiagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection. *J Vet Sci.* 6: 349–352.
73. Oh J, Lee KW, Choi HW, Lee C. 2014. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Virus Res* 149:175–182. doi: 10.1007/s00705-014-2163-7
74. Oka T, Saif LJ, Marthaler D, Esseili MA, Meulia T, Lin CM, Vlasova AN, Jung K, Zhang Y, Wang Q. 2014. Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Vet Microbiol* 173, 258–269. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.08.012
75. [OIE] World Organization for Animal Health. 2014. Infection with Porcine Epidemic Diarrhoea Virus. OIE Technical Factsheet [Internet] Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Media_Center/docs/pdf/factsheet_PEDV
76. [OMS] Organización Mundial de la Salud. 2016. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). [Internet] [25 de Julio de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en>
77. Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Zhang J, Halbur PG. 2014. Porcine epidemic diarrhea virus RNA present in commercial spray-dried porcine plasma is not infectious to naïve pigs. *PLoS One.* 9(8):e104766. doi:10.1371/journal.pone.0104766
78. Pan Y, Tian X, Li W, Zhou Q, Wang D, Bi Y, Chen F, Song Y. 2012. Isolation and characterization of a variant porcine epidemic diarrhea virus in China. *Virology Journal* 9:195. doi:10.1186/1743-422X-9-195
79. Pasick J, Berhane Y, Ojkic D, Maxie G, Embury-Hyatt C, Swekla K, Handel K, Fairles J, Alexandersen S. 2014. Investigation into the role of potentially contaminated feed as a source of the first-detected outbreaks of porcine epidemic diarrhea in Canada. *Transbound Emerg Dis.* 61(5):397–410. doi: 10.1111/tbed.12269

80. Park JE, Cruz DJ, Shin HJ. 2014. Clathrin- and serine proteases-dependent uptake of porcine epidemic diarrhea virus into Vero cells. *Virus Res* 191, 21-29. doi: 10.1016/j.virusres.2014.07.022
81. Park JE, Shin HJ. 2014. Porcine epidemic diarrhea virus infects and replicates in porcine alveolar macrophages. *Virus Res* 191,143–152. doi: 10.1016/j.virusres.2014.07.038
82. Park SJ, Song DS, Park BK. 2013. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhoea (PEDV) field isolates in Korea. *Arch Virol* 158:1533-1541. doi: 10.1007/s00705-013-1651-5
83. Park SJ, Moon HJ, Luo Y, Kim HK, Kim EM, Yang JS, Song DS, Kang BK, Lee CS, Park BK. 2008. Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild- and attenuated-type porcine epidemic diarrhea viruses. *Virus Genes*. 36(1):95-104. doi: 10.1007/s11262-007-0164-2
84. Park SJ, Moon HJ, Yang JS, Lee CS, Song DS, Kang BK, Park BK. 2007. Sequence analysis of the partial spike glycoprotein gene of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Genes* (2007) 35:321–332. doi: 10.1007/s11262-007-0096-x
85. Pospischil A, Stuedli A, Kiupel M. 2002. Diagnostic notes update on porcine epidemic diarrhea. *J Swine Health Prod.*10:81–85.
86. Puranaveja S, Poolperm P, Lertwatcharasarakul P, Kesdaengsakonwut S, Boonsoongnern A, Uairong K, Kitikoon P, Choojai P, Kedkovid R, Teankum K, Thanawongnuwech R. 2009. Chinese-like Strain of Porcine Epidemic Diarrhea Virus, Thailand. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 15, No. 7.
87. Ramírez M, More J, Manchego A, Rivera H. 2014. Presencia del virus de la gastroenteritis transmisible en granjas porcinas de Lima-Perú. En: XXIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias PANVET 2014; Sesión de Salud de especies productivas; 2014 Octubre 6-9; La Habana, Cuba.
88. Ren X, Suo S, Jang YS. 2011. Development of a porcine epidemic diarrhea virus M protein-based ELISA for virus detection. *Biotechnol Lett* 33:215–220. doi: 10.1007/s10529-010-0420-8
89. Saif LJ, Pensaert M, Sestak K, Yeo SG, Jung K. 2012. Coronaviruses. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. Eds. *Diseases of Swine*, tenth ed. Wiley-Blackwell, Iowa State University, Ames, IA, USA. 501-524p.
90. Sampedro F, Snider T, Bueno I, Bergeron J, Urriola P, Davies P. 2015. Risk assessment of feed ingredients of porcine origin as vehicles for transmission of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). [Internet] [7 Setiembre 2015] Disponible en: <http://research.pork.org/Results/ResearchDetail.aspx?id=1812>
91. Sasaki Y, Alvarez J, Sekiguchi S, Sueyoshi M, Otake S, Perez A. Epidemiological factors associated to spread of porcine epidemic diarrhea in Japan. *Prev Vet Med*. 2016;123:161–167. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.11.002
92. Sato T, Takeyama N, Katsumata A, Tuchiya K, Kodama T, Kusanagi K. 2011. Mutations in the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus associated with growth adaptation in vitro and attenuation of virulence in vivo. *Virus Genes*43:72-78. doi:10.1007/s11262-011-0617-5

93. Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SG. 2007. A Contemporary View of Coronavirus Transcription. *J Virol.* 81(1): 20-29. doi: 10.1128/JVI.01358-06
94. Sawicki SG. 2009. Coronavirus Genome Replication. In: Cameron CE, Gotte M, Raney KD. Eds. *Viral Genome Replication*. USA. Springer Science Business Media LLC 2009. p25-39. doi: 10.1007/b135974-2
95. [SENASA] Servicio Nacional de Sanidad Agraria. 2013. Dirección de Sanidad Animal. Ministerio de Agricultura y Riego. República del Perú. Boletín Epidemiológico. Semana Epidemiológica N°40-44. [Internet] [Octubre de 2013]. Disponible en: http://www.senasa.gob.pe/0/modulos/JER/JER_Interna.aspx?ARE=0&PFL=1&JER=190
96. Shirato K, Matsuyama S, Ujike M, Taguchi F. 2011. Role of Proteases in the Release of Porcine Epidemic Diarrhea Virus from Infected Cells. *Journal of Virology.* 85:15, 7872-7880. doi:10.1128/JVI.00464-11
97. Smith EC, Denison MR. 2003. Coronaviruses as DNA Wannabes: A New Model for the Regulation of RNA Virus Replication Fidelity. *PLoS Pathog.* 9 (12): e1003760. doi:10.1371/journal.ppat.1003760
98. Song D, Moon H, Kang B. 2015. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin Exp Vaccine Res* 4:166-176. doi: 10.7774/cevr.2015.4.2.16
99. Song D, Park B. 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44:167-175. doi: 10.1007/s11262-012-0713-1
100. Song DS, Oh JS, Kang BK, Yang JS, Moon HJ, Yoo HS, Jang YS, Park BK. 2007. Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain. *Res Vet Sci.* 82:134–40. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.03.007
101. Song X, Zhao X, Huang Y, Xiang H, Zhang W, Tong D. 2015. Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) Infection Alters the Expression of Cellular MicroRNA Species That Affect Transcription of TGEV Gene 7. *Int J Biol Sci* 11(8):913-922. doi:10.7150/ijbs.11585.
102. Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Sun D, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ, Koster LG, Killian ML, Yoon KJ. 2013. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: Clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest.* 25(5):649-654. doi: 10.1177/1040638713501675
103. Sun DB, Feng L, Shi HY, Chen JF, Liu SW, Chen HY, Wang YF. 2007. Spike protein region (aa 636–789) of porcine epidemic diarrhea virus is essential for induction of neutralizing antibodies. *Acta Virol.* 51:149–56.
104. Sun R, Leng Z, Zhai SL, Chen D, Song C. 2014. Genetic Variability and Phylogeny of Current Chinese Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains Based on Spike, ORF3, and Membrane Genes. *The Scientific World Journal* 2014:208439. doi:10.1155/2014/208439
105. Suo S, Ren Y, Li G, Zarlenga D, Bu R, Su D, Li P, Meng F, Wang C, Ren X. 2012. Immune responses induced by DNA vaccines bearing Spike gene of PEDV combined with porcine IL-18. *Virus Research* 167, 259–266. doi: 10.1016/j.virusres.2012.05.007

106. Suzuki T, Murakami S, Takahashi O, Kodera A, Masuda T, Itoh S, Miyazaki A, Ohashi S, Tsutsui T. 2015. Molecular characterization of pig epidemic diarrhoea viruses isolated in Japan from 2013 to 2014. *Infect Genet Evol* 36, 363-368. doi: 10.1016/j.meegid.2015.10.017
107. Takahashi K, Okada K, Ohshima K. 1983. An outbreak of swine diarrhea of a newtype associated with coronavirus-like particles in Japan. *Nihon Juigaku Zasshi* 45:829-832.
108. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30: 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197
109. Temeeyasen G, Srijangwad A, Tripipat T, Tipsombatboon P, Piriyaongsa J, Phoolcharoen W, Chuanasa T, Tantutuvanont A, Nilubol D. 2014. Genetic diversity of ORF3 and spike genes of porcine epidemic diarrhea virus in Thailand. *Infect Genet Evol* 21, 205-213. doi:10.1016/j.meegid.2013.11.001
110. Thomas P, Karriker LA, Ramirez A, Zhang J, Ellingson JS, Holtkamp DJ. Methods for inactivating PEDV in Hog Trailers. 2014. In: Twenty-second Annual Swine Disease Conference for Swine Practitioners. p. 43–50.
111. Thompson J, Higgins D, Gibson T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of the progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680. doi:10.1007/978-1-4020-6754-9_3188
112. Tian PF, Jin YL, Xing G, Qv LL, Huang YW, Zhou JY. 2014. Evidence of recombinant strains of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2013. *Emerg Infect Dis.* 20:1735–1738. doi: 10.3201/eid2010.140338
113. Trudeau MP, Verma H, Sampedro F, Urriola PE, Shurson GC, McKelvey J, Pillai SD, Goyal SM. 2016. Comparison of Thermal and Non-Thermal Processing of Swine Feed and the Use of Selected Feed Additives on Inactivation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV). *PLoS One* 11(6):e0158128. doi: 10.1371/journal.pone.0158128
114. [USDA-APHIS] United States Department of Agriculture - Animal and Plant Health Inspection Service. 2014. Veterinary Services Information Management Procedures for Swine Enteric Coronavirus Disease (SECD). Disponible en: https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/animal-disease-information/swine-disease-information/ct_ped_info
115. Vlasova AN, Marthaler D, Wang Q, Culhane MR, Rossow KD, Rovira A, Collins J, Saif LJ. 2014. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV, North America, May 2013–February 2014. *Emerg Infect Dis.* 20:1620–8. doi: 10.3201/eid2010.140491
116. [VBSD-ADRDL] Veterinary & Biomedical Sciences Department. Animal Disease Research and Diagnostic Laboratory. South Dakota State University. 2014. DNA Sequencing of Porcine Epidemic Diarrhea Virus S1. Laboratory Manual.
117. Vui DT, Tung N, Inui K, Slater S, Nilubol D. 2014. Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhea virus in Vietnam. *Genome Announc.* 2:e00753. doi: 10.1128/genomeA.00753-14
118. Wang L, Byrum B, Zhang Y. 2014. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 20(5):917-919. doi: 10.3201/eid2005.140195

119. Wang Y , Gao X , Yao Y , Zhang Y , Lv C , Sun Z , Wang Y , Jia X , Zhuang J, Xiao Y , Li X , Tian K. 2015. The dynamics of Chinese variant porcine epidemic diarrhea virus production in Vero cells and intestines of 2-day old piglets. *Virus Res* 208, 82-88. doi: 10.1016/j.virusres.2015.06.009
120. Wang K, Lu W, Chen J, Xie S, Shi H, Hsu H, Yu W, Xu K, Bian C, Fischer WB, Schwarz W, Feng L, Sun B. 2012. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. *FEBS Letters* 586, 384–391. doi:10.1016/j.febslet.2012.01.005
121. Wicht O. 2014. Proteolytic Activation of the Coronavirus Fusion Protein. Doctoral Thesis. The Netherlands: University of Utrecht. 145p.
122. Wicht O, Li W, Willems L, Meuleman TJ, Wubbolts RW, van Kuppeveld FJ, Rottier PJM, Bosch BJ. 2014. Proteolytic Activation of the Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus Spike Fusion Protein by Trypsin in Cell Culture. *J. Virol.* 88:14, 7952–7961. doi: 10.1128/JVI.00297-14
123. Woo PC, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, Bai R, Teng JLL, Tsang CCC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY. 2012. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in Deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *J. Virol.* 86:7, 3995-4008. doi:10.1128/JVI.06540-11
124. Xing Y, Chen J, Tu J, Zhang B, Chen X, Shi H, Baker SC, Feng L, Chen Z. 2013. The papain-like protease of porcine epidemic diarrhea virus negatively regulates type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase. *J Gen Virol.* 94:1554–1567. doi: 10.1099/vir.0.051169-0
125. Zhang Q, Shi K, Yoo D. 2016. Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1. *Virology* 489:252–268. doi: 10.1016/j.virol.2015.12.010

VIII. Anexos

Anexo 1. Protocolo de extracción de ARN viral.

Kit comercial: QIAamp® Viral RNA Kit (QIAGEN, USA).

Preparación de Reactivos:

- Preparación de Buffer AVL y RNA buffer Carrier-AVE:
Para una muestra:
560ul de Buffer AVL + 5.6ul de Carrier-AVE

Procedimiento:

1. Colocar 560ul de Buffer AVL (preparado) en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml.
2. Agregar 140ul de muestra.
3. Dar vórtex ligero por 15 segundos.
4. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 10 minutos.
5. Centrifugar ligeramente para remover las gotas en la tapa del tubo.
6. Agregar 560ul de etanol (96-100%). Mezclar por vórtex (pulsos) por 15 segundos. Centrifugar ligeramente para remover las gotas en la tapa del tubo.
7. Colocar 630ul de la solución en la columna.
8. Centrifugar a 6000g por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo de colección. Eliminar el tubo anterior con el filtrado.
9. Repetir los pasos N° 7 y 8 (para terminar de pasar toda la solución).
10. Colocar 500ul de Buffer AW1.
11. Centrifugar a 6000g por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo de colección. Eliminar el tubo anterior con el filtrado.
12. Colocar 500ul de Buffer AW2.
13. Centrifugar a 20 000g por 3 minutos. Colocar la columna en un nuevo tubo de colección. Eliminar el tubo anterior con el filtrado.
14. Centrifugar a 20 000g por 1 minuto.
15. Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml.
16. Adicionar 60ul de Buffer AVE (temperatura ambiente).
17. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
18. Centrifugar a 6000g por 1 minuto.
19. Conservar a -70°C.

Anexo 2. Protocolo de Extracción y Purificación de ADN a partir de gel de agarosa.

Kit Comercial: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Procedimiento:

1. Preparación de Solución de Lavado.
2. Disolución de gel de agarosa.
 - 2.1. Agregar la solución de unión a membrana a razón de 10ul por cada 10mg del corte de gel de agarosa (1ul por cada 1mg).
 - 2.2. Mezclar por vórtex e incubar a 50-65°C por 10 minutos o hasta que el gel se haya disuelto completamente. Vórtex cada 2-3 minutos. Centrifugar ligeramente a temperatura ambiente para asegurar que los contenidos estén en el fondo del tubo. Una vez que la agarosa se disolvió, no volverá a solidificarse a temperatura ambiente.
3. Purificación de ADN por centrifugación.
 - 3.1. Transferir la mezcla de gel disuelto a las minicolumnas e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
 - 3.2. Centrifugar a 16000g (14000 rpm) por 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de colección y volver a colocarlo con el cartucho.
 - 3.3. Adicionar 700ul de Solución de Lavado (previamente diluido con etanol 95%).
 - 3.4. Centrifugar a 16000g (14000 rpm) por 1 minuto. Eliminar el líquido del tubo de colección y volver a colocarlo al cartucho.
 - 3.5. Adicionar 500ul de Solución de Lavado.
 - 3.6. Centrifugar a 16000g (14000 rpm) por 5 minutos. Eliminar el líquido del tubo de colección y volver a colocarlo al cartucho.
 - 3.7. Centrifugar a 16000g (14000 rpm) por 1 minuto, con la tapa de la Microcentrífuga abierta para permitir la evaporación de etanol residual.
 - 3.8. Colocar el cartucho en un tubo de colección (de 1.5ml) y adicionar 50ul de agua libre de nucleasas directamente al centro de la columna (sin tocar la membrana).
 - 3.9. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
 - 3.10. Centrifugar a 16000g (14000 rpm) por 1 minuto.
 - 3.11. Conservar el ADN eluido a 4°C o -20°C.

Anexo 3. Información de las cepas referenciales PEDV globales utilizadas para el análisis filogenético de las cepas PEDV peruanas.

Id	N° acceso GeneBank	Geno-grupo	Id	N° acceso GeneBank	Geno-grupo
Cepas Estadounidenses			Cepas Canadienses		
USA/Indiana12.83/2013	KJ645635.1	1	CAN/Quebec334/2014	KR265831.1	1
USA/Iowa106/2013	KJ645695.1	1	ON-018	KM189367.2	1
USA/Minnesota52/2013	KJ645704.1	1	MB-021	KM196111.1	1
USA/Ohio126/2014	KJ645702.1	1	PEI-023	KM189368.1	1
USA/Iowa23.57/2013	KJ645649.1	1	SK-030	KM196109.1	2
USA/Minnesota58/2013	KJ645655.1	1	Cepas Mexicanas		
USA/Iowa107/2013	KJ645696.1	1	MEX/104/2013	KJ645708.1	1
USA/IA/2013/49379	KM975736.1	1	MEX/124/2014	KJ645700.1	1
USA/Minnesota72/2013	KJ645667.1	2	Cepa Colombiana		
USA/Ohio123/2014	KJ645699.1	2	COL/Cundinamarca/2014	KU569509.1	1
USA/Minnesota71/2013	KJ645706.1	2	Cepa Ecuatoriana		
USA/Minnesota61/2013	KJ645705.1	2	ECUADOR/Cotopaxi/2014	KT336490.1	1
USA/Minnesota77/2013	KJ645672.1	2	Cepa Prototipo		
USA/Minnesota76/2013	KJ645671.1	2	CV777	KT323979.1	1
USA/Indiana34/2013	KJ645641.1	2	Cepas Chinas		
USA/NorthCarolina40/2013	KJ645646.1	2	LZC	EF185992.1	1
USA/Minnesota59/2013	KJ645656.1	2	SD-M	JX560761.1	1
USA/Minnesota82/2013	KJ645676.1	2	CH/S	JN547228.1	1
USA/Illinois87/2013	KJ645680.1	2	JS2008	KC210146.1	1
USA/Minnesota89/2013	KJ645681.1	2	CH-LCC-02-2011	KP399634.1	2
USA/Minnesota62/2013	KJ645658.1	2	CH-SBC-12-2011	KP399633.1	2
USA/Minnesota90/2013	KJ645682.1	2	CH/GDGZ/2012	KF384500.1	2
USA/NorthCarolina91/2013	KJ645683.1	2	GD-1	JX647847.1	2
USA/Minnesota73/2013	KJ645668.1	2	GD-A	JX112709.1	2
USA/Minnesota127/2014	KJ645703.1	2	GD-B	JX088695.1	2
USA/Iowa103/2013	KJ645694.1	2	BJ-2011-1	JN825712.1	2
USA/Missouri101/2013	KJ645692.1	2	LC	JX489155.1	2
USA/Minnesota100/2013	KJ645691.1	2	CH/ZMDZY/11	KC196276.1	2
USA/Illinois98/2013	KJ645690.1	2	AJ1102	JX188454.1	2
USA/Illinois97/2013	KJ645689.1	2	CH/FJZZ-9/2012	KC140102.1	2
USA/Oklahoma35/2013	KJ645642.1	2	ZJCZ4	JX524137.1	2
USA/Kansas125/2014	KJ645701.1	2	CH/FJND-3/2011	JQ282909.1	2
USA/Minnesota65/2013	KJ645661.1	2	AH2012	KC210145.1	2
USA/NorthCarolina66/2013	KJ645662.1	2	CHGD-01	JX261936.1	2
USA/Kansas29/2013	KJ645637.1	2	JS-HZ2012	KC210147.1	2
USA/Colorado30/2013	KJ645638.1	2	Cepas Coreanas		
USA/Texas31/2013	KJ645639.1	2	SM98	GU937797.1	1
USA/Oklahoma32/2013	KJ645640.1	2	virulent DR13	JQ023161.1	1
USA/Kansas36/2013	KJ645643.1	2	attenuated DR13	JQ023162.1	1
USA/Minnesota41/2013	KJ645647.1	2			
USA/Iowa96/2013	KJ645688.1	2			
MN	KF468752.1	2			
IA1	KF468753.1	2			
IA2	KF468754.1	2			

Secuencias disponibles en GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

..

Anexo 4. Tabla de distancia genética entre las cepas PEDV peruanas y cepas referenciales, basada en el análisis del dominio S1.

[illegible]

* Software MegAlign 7.0.

Anexo 5. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas del dominio S1 del gen S de las cepas PEDV peruanas.

Se observan las diferencias entre las cepas G1 (S-INDEL) con respecto a las cepas G2. Las inserciones y deleciones se observan en color celeste y rosado respectivamente (Cepas S-INDEL: PERU/LIMA11/2014; USA/Iowa106/2013; USA/Iowa106/2013). Las mutaciones puntuales se señalan en amarillo. Software MegAlign 7.0.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

